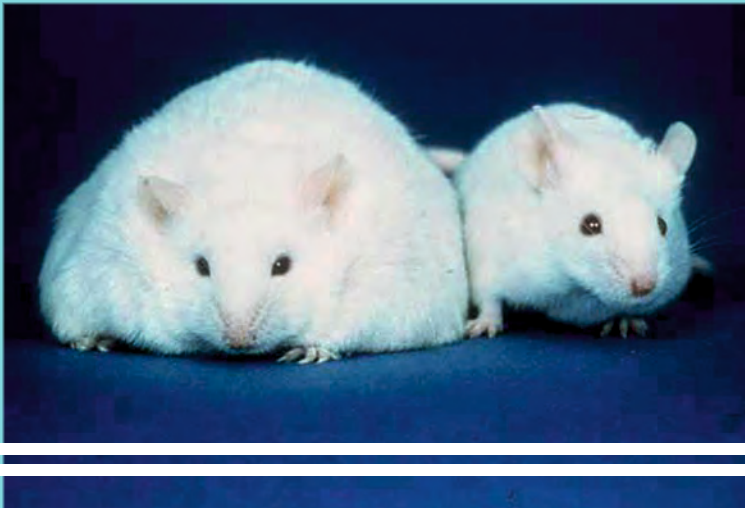


Morphologische Veränderungen der Kardiomyozyten, der
Kapillaren und der Innervation bei ernährungsbedingter
Hyper- und Atrophie des Herzens der Maus

CARINA GRUBER



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2012

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2012

© 2012 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Martin Bergmann

und

dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Anatomie 1

Betreuer: PD. Dr. Christian Mühlfeld

**Morphologische Veränderungen der Kardiomyozyten, der Kapillaren und
der Innervation bei ernährungsbedingter Hyper- und Atrophie
des Herzens der Maus**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Carina Gruber

Tierärztin aus Heilbronn

Gießen 2011

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan

Prof. Dr. Dr. h. c. M. Kramer

Gutachter

Prof. Dr. M. Bergmann

Prof. Dr. C. Mühlfeld

Tag der Disputation

30.01.2012

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Tabellenverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
1. Einleitung	1
1.1 Anatomie des Herzens bei Säugetieren	1
1.1.1 Fein- und Ultrastruktur des Herzens	1
1.1.2 Fein- und Ultrastruktur des Nervensystems des Herzens	4
1.2. Literaturübersicht	8
1.2.1 Morphologische Veränderungen des Herzens bei Hyper- und Atrophie	8
<i>1.2.1.1 Myokardzusammensetzung und Myozyten</i>	<i>8</i>
<i>1.2.1.2 Kapillaren</i>	<i>10</i>
<i>1.2.1.3 Innervation</i>	<i>11</i>
1.2.2 Funktionelle Störungen des Herzens durch Hyper- und Atrophie	12
<i>1.2.2.1 Herzfunktion</i>	<i>12</i>
<i>1.2.2.2 Funktion des autonomen Nervensystems</i>	<i>13</i>
1.3 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	14
2. Material und Methoden	16
2.1 Tiermodelle und Gewebepreparation	16
2.1.1 Tiermodelle	16
2.1.2 Vorbereitung der Herzen für die Gewebeeinbettung und die Mikroskopie	19
2.2 Gewebeeinbettung	21
2.2.1. Eponeinbettung	21
2.2.2 Paraffin-Einbettung	22
2.2.3 Gefriereinbettung	24

2.3 Methoden zur Auswertung der einzelnen Parameter	24
2.3.1 Immunhistochemie	24
2.3.1.1 Immunperoxidase- Verfahren	24
2.3.1.2 Immunfluoreszenz	26
2.3.2 Übersicht über die bestimmten Parameter	27
2.3.3 Berechnung der Parameter im Einzelnen	30
2.3.3.1 Körper- und Herzdimensionen	30
2.3.3.2 Myokardzusammensetzung	30
2.3.3.3 Kardiomyozyten	33
2.3.3.4 Kapillaren	34
2.3.3.5 Innervation	35
2.4 Statistik	42
3. Ergebnisse	43
3.1 Qualitative Beurteilung	43
3.1.1. Lichtmikroskopische Beurteilung	43
3.1.2 Elektronenmikroskopische Beurteilung	43
3.2 Quantitative Ergebnisse	48
3.2.1 Tierversuchsgruppe Adipositas	48
3.2.1.1 Körper- und Herzdimensionen	48
3.2.1.2 Myokardzusammensetzung	48
3.2.1.3 Kardiomyozyten	49
3.2.1.4 Kapillaren	49
3.2.1.5 Innervation	49
3.2.2 Tierversuchsgruppe Unterernährung	54
3.2.2.1 Körper- und Herzdimensionen	54
3.2.2.2 Myokardzusammensetzung	54
3.2.2.3 Kardiomyozyten	54
3.2.2.4 Kapillaren	55
3.2.2.5 Innervation	55

4. Diskussion	59
4.1 Methodenkritik	59
4.1.1. Tierversuch	59
4.1.2 Probenentnahme	61
4.1.3 Fixierung, Einbettung und Bearbeitung der Proben	62
4.1.4 Methode der Stereologie	68
4.1.4.1 Gewebeorientierung (<i>tissue orientation</i>)	70
4.1.4.2 Testsysteme	70
4.1.4.3 Probenzahl (<i>sample size</i>)	71
4.1.4.4 weitere stereologische Aspekte	71
4.2 Diskussion der Ergebnisse im Vergleich mit Daten aus der Literatur	73
4.2.1 Adipositas	73
4.2.1.1 Entstehung einer Herzhypertrophie	73
4.2.1.2 Verhältnis von linkem Ventrikel- zu Körpergewicht	76
4.2.1.3 Myokard und Kardiomyozyten	77
4.2.1.4 Kapillaren	82
4.2.1.5 Innervation	84
4.2.2 Unterernährung	87
4.2.2.1 Entstehung einer Herzatrophie	87
4.2.2.2 Verhältnis von linkem Ventrikel- zu Körpergewicht	87
4.2.2.3 Myokard und Kardiomyozyten	89
4.2.2.4 Kapillaren	92
4.2.2.5 Innervation	93
4.3 Ausblick	94
5. Zusammenfassung	95
6. Literaturverzeichnis	97

7. Materialübersicht	117
7.1 Eingesetzte Substanzen	117
7.1.1 Chemikalien	117
7.1.2 Seren	118
7.1.3 Primäre Antikörper	119
7.1.4 Sekundäre Antikörper	119
7.1.5 sonstige Substanzen	119
7.2 Puffer und Lösungen	120
8. Anhang	123

Tabellenverzeichnis

	Seite
Tabelle 2.1 Körpergewicht und Gewicht des linken Ventrikels der Tiere der Adipositasgruppe und der dazugehörigen Kontrollgruppe	17
Tabelle 2.2 Körpergewicht und Gewicht des linken Ventrikels der Tiere der Unterernährungsgruppe und der dazugehörigen Kontrollgruppe	19
Tabelle 2.3 Paraffineinbettung: Substanzen und Zeiträume der Inkubation	22
Tabelle 2.4 Übersicht über die bestimmten Parameter bezüglich Körper- und Herzdimensionen	28
Tabelle 2.5 Übersicht über die bestimmten Parameter bezüglich der Myokardzusammensetzung	28
Tabelle 2.6 Übersicht über die bestimmten Parameter bezüglich der Kardiomyozyten	28
Tabelle 2.7 Übersicht über die bestimmten Parameter bezüglich der Kapillaren	29
Tabelle 2.8 Übersicht über die bestimmten Parameter bezüglich der Innervation	29
Tabelle 2.9 Übersicht über die Messung der Parameter und die dazu verwendeten Schnitte, Färbungen und Vergrößerungen	41
Tabelle 3.1 Übersicht über die einzelnen Ergebnisse der Parameter bezüglich der Körper- und Herzdimensionen der Adipositastiere und der zugehörigen Kontrolltiere	50
Tabelle 3.2 Übersicht über die einzelnen Ergebnisse der Parameter bezüglich der Myokardzusammensetzung der Adipositastiere und der zugehörigen Kontrolltiere	51
Tabelle 3.3 Übersicht über die einzelnen Ergebnisse der Parameter bezüglich der Kardiomyozyten der Adipositastiere und der zugehörigen Kontrolltiere	51

Tabelle 3.4	Übersicht über die einzelnen Ergebnisse der Parameter bezüglich der Kapillaren der Adipositastiere und der zugehörigen Kontrolltiere	52
Tabelle 3.5	Übersicht über die einzelnen Ergebnisse der Parameter bezüglich der Innervation der Adipositastiere und der zugehörigen Kontrolltiere	52
Tabelle 3.6	Übersicht über die einzelnen Ergebnisse der Parameter bezüglich der Körper- und Herzdimensionen der unterernährten Tiere und der zugehörigen Kontrolltiere	56
Tabelle 3.7	Übersicht über die einzelnen Ergebnisse der Parameter bezüglich der Myokardzusammensetzung der unterernährten Tiere und der zugehörigen Kontrolltiere	56
Tabelle 3.8	Übersicht über die einzelnen Ergebnisse der Parameter bezüglich der Kardiomyozyten der unterernährten Tiere und der zugehörigen Kontrolltiere	56
Tabelle 3.9	Übersicht über die einzelnen Ergebnisse der Parameter bezüglich der Kapillaren der unterernährten Tiere und der zugehörigen Kontrolltiere	57
Tabelle 3.10	Übersicht über die einzelnen Ergebnisse der Parameter bezüglich der Innervation der unterernährten Tiere und der zugehörigen Kontrolltiere	57

Abbildungsverzeichnis

		Seite
Abbildung 1.1	Schwannsche Zelle mit drei Axonen	6
Abbildung 2.1	Verlauf des Blutglucosespiegels bei den Tieren der Adipositas- und der Kontrollgruppe in Abhängigkeit von der Zeit	18
Abbildung 2.2	Bestimmung der Volumendichte der Myozyten und des Interstitiums anhand eines Punkte-Rasters	31
Abbildung 2.3	Bestimmung der Oberflächendichte der Myozyten anhand eines Linien-Rasters	33
Abbildung 2.4	Bestimmung der Längendichte der Nervenfasern mit Hilfe eines Zählfeldes	37
Abbildung 2.5	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zur Bestimmung des Anteils der sympathischen Nervenfasern in den Vorhöfen	40
Abbildung 3.1	Lichtmikroskopische Aufnahmen des Myokards	45
Abbildung 3.2	Elektronenmikroskopische Aufnahmen, die die Morphologie der Kardiomyozyten, der Kapillaren und der Nervenfasern der Adipositas- und der Kontrolltiere im Vergleich zeigen	46
Abbildung 3.3	Elektronenmikroskopische Aufnahmen, die die Morphologie der Kardiomyozyten, der Kapillaren und der Nervenfasern der unterernährten Tiere und der Kontrolltiere im Vergleich zeigen	47
Abbildung 3.4	Graphische Darstellung der wichtigsten Daten bezüglich der Adipositastiere im Vergleich zu den Kontrolltieren	53
Abbildung 3.5	Graphische Darstellung der wichtigsten Daten bezüglich der unterernährten Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren	58

1. Einleitung

Das Herz schlägt ungefähr 1,1 Billionen Mal im Leben eines Säugetieres. Dabei durchströmt ein Blutvolumen von 200 Millionen Liter pro Kilogramm (kg) Herzmasse das Herz. Jedem Säuger steht, Berechnungen zufolge, während des gesamten Lebens ein maximales Sauerstoffvolumen von 38 Liter Sauerstoff pro Gramm (g) Körpermasse zur Verfügung. Mit zunehmender Körpermasse sinkt die Herzfrequenz und damit auch der spezifische Sauerstoffverbrauch. Im Gegensatz dazu nimmt die Lebenserwartung zu, was an einem Zahlenbeispiel verdeutlicht werden soll: Ein Blauwal, der 100.000 kg wiegt und eine Herzmasse von 600 kg hat, erreicht ein sehr hohes Alter von durchschnittlich 118 Jahren und hat dabei eine Herzfrequenz von sechs Schlägen pro Minute. Dadurch verbraucht er genauso viel Sauerstoff wie eine Feldspitzmaus, die 2 g Körpermasse und 0,012 g Herzmasse hat und bei einer Herzfrequenz von 1000 Schlägen pro Minute ca. ein Jahr lebt. Nur die Spezies Mensch bildet hier eine Ausnahme. Die nach diesem Prinzip berechnete Lebenserwartung von 28 Jahren ist aufgrund der Fortschritte von Wissenschaft, Technologie und Medizin auf 80 Jahre angestiegen (Dobson 2003).

1.1 Anatomie des Herzens bei Säugetieren

1.1.1 Fein- und Ultrastruktur des Herzens

Das Herz der Säugetiere unterscheidet sich im Allgemeinen nur in Größe und Form, der grundsätzliche Aufbau ist gleich. Die Wand des Herzens setzt sich von innen nach außen aus dem Endokard, dem Myokard und dem Epikard zusammen, wobei sich der Aufbau dieser Schichten zwischen den Binnenräumen des Herzens unterscheidet. Da die Morphologie der Herzmuskelzelle in der vorliegenden Arbeit aber nur am linken Ventrikel untersucht wurde, wird auf Hinweise zu Unterschieden verzichtet.

Das Endokard kleidet die Binnenräume des Herzens von innen aus und setzt sich in die Intima der Gefäße fort. Es besteht aus dem Endothel (einschichtiges Plattenepithel), einer

dünnen subendokardialen Schicht aus lockerem Bindegewebe und einer abschließenden dickeren Bindegewebsschicht. Letztere geht in das interstitielle Bindegewebe des Myokards über und sorgt somit für festen Zusammenhalt von Endo- und Myokard (Canale et al. 1986).

Das Myokard setzt sich aus den Kardiomyozyten (Herzmuskelzellen) und dem dazwischen liegenden Interstitium (lockeres Bindegewebe) zusammen. Das zarte Interstitium, das direkt die einzelnen Myozyten umgibt, wird als Endomysium bezeichnet, in ihm verlaufen Kapillaren und kleinste Nervenfasern. Dagegen umschließt das etwas kräftigere Perimysium gleich mehrere Myozyten und fasst diese so zu Bündeln zusammen. Es schließt größere Gefäße und Nerven mit ein. Grundsätzlich hat das Interstitium die Aufgabe, die Herzmuskelzellen zu versorgen und ihnen Stabilität zu geben (Cauldfield und Borg 1979). Neben den Kardiomyozyten, die das Arbeitsmyokard bilden, findet man auch spezialisierte Herzmuskelzellen, die das autonome Erregungsbildungs- und -leitungssystem des Herzens bilden.

Die Herzmuskelzellen stellen sich als dünne und langgestreckte Zellen dar, die beim Menschen ein oder zwei zentrale Zellkerne enthalten, bei anderen Säugetierspezies auch deutlich mehr (Länge 50-150 μm , Breite 10-20 μm). Man kann eine sehr ähnliche Querstreifung wie bei den Skelettmuskelzellen erkennen. Zwischen den benachbarten Zellen gibt es mechanische und impulsleitende Zellkontakte, wobei die *Disci intercalares* (Glanzstreifen) lichtmikroskopisch erkennbare Zellkontakte darstellen, die die Enden der Muskelzellen mechanisch miteinander verbinden und bei denen es sich um Einstülpungen der Oberflächenmembranen zweier Zellenden ineinander handelt (Ogata et al. 1990). Die *Disci intercalares* werden zusätzlich durch Desmosomen (*Maculae adhaerentes*) stabilisiert, indem diese die Aktinfilamente in der Plasmamembran verankern (Sommer und Jennings 1986). Über die *gap junctions* wird eine rasche Weiterleitung von Erregungsimpulsen durch Ionenflüsse von einer Zelle zur nächsten ermöglicht (Forbes et al. 1982).

Neben den *Disci intercalares* gibt es noch weitere Einstülpungen des Sarkolemmas (Zellmembran der Herzmuskelzelle): das transversale oder tubuläre System (T-System), bei dem es sich um schlauchförmige Einstülpungen des Sarkolemmas handelt und das der schnelleren Impulsweiterleitung von der Zellmembran ins Zellinnere dient. Es steht in

räumlichem und funktionellem Kontakt mit dem Sarkoplasmatischen Retikulum, das auch longitudinales oder L-System genannt wird, da es senkrecht zum T-System verläuft (Forssmann und Girardier 1970). Das Sarkoplasmatische Retikulum umgibt netzartig die einzelnen Myofibrillen und seine Funktion besteht hauptsächlich darin, Kalzium intrazellulär zu speichern und zu transportieren (Sommer und Jennings 1986).

Die Plasmamembran der Herzmuskelzelle besteht aus einer Phospholipid- Doppelschicht, in die integrale und periphere Proteine eingelagert sind, sie wird als sogenanntes „fluid mosaic model“ bezeichnet und ermöglicht es der Zelle, mit ihrer Umgebung zu kommunizieren (Singer und Nicolson 1972). Überzogen ist die Plasmamembran der Myozyten von der Glykokalix, einer Schicht aus Zuckerresten. Entsprechend dem Aufbau anderer Zellen, besitzt auch die Herzmuskelzelle einen Golgi-Apparat, Glykogenpartikel, die diffus im Sarkoplasma (Zytoplasma der Myozyten) verteilt sind und Lipidtropfen, die meist in engem Kontakt zu den Mitochondrien stehen (Sommer und Jennings 1986). Den Mitochondrien unterliegt die wichtige Aufgabe der Energiebereitstellung für den Kontraktionsvorgang durch Produktion von ATP. Der Matrixraum der Mitochondrien wird von zwei Membranen umgeben (Zick et al. 2009), von denen die äußere eine permeable Biomembran, die Innere im Gegensatz dazu hochspezialisiert ist. Diese innere Membran wirft je nach Aktivität der Mitochondrien mehr oder weniger eng aneinander gelagerte Cristae auf, die in den Matrixraum reichen und so dessen Volumen beeinflussen (Hackenbrock 1968). Zusätzlich kann man im Sarkoplasma der Herzmuskelzelle Lipofuszingranula finden; dies sind dunkelgelbe bis braune Residualkörperchen, die vor allem mit zunehmendem Alter vermehrt auftreten und deshalb auch häufig als Alterspigment bezeichnet werden. Sie sind von einer einfachen Membran umgeben und enthalten in ihrem Inneren Abbauprodukte des Fettstoffwechsels. (Jamieson und Palade 1964).

Bemerkenswert ist, dass jede Säugetierspezies eine charakteristisch quantitative Zusammensetzung des Myokards besitzt (Schaper et al. 1985, Oron und Mandelberg 1985). Je kleiner die Körpermasse eines Säugers, desto größer der Volumenanteil der Mitochondrien. Dieser beträgt beim Menschen 25%, während die Mitochondrien bei der Maus deutlich mehr, nämlich 38% des Volumens der Myozyten ausmachen (Barth et al. 1992).

Für die Kontraktion der Herzmuskulatur sind die Myofibrillen verantwortlich, die aus Aktin- und Myosinfilamenten bestehen und die sich in großer Anzahl parallel anordnen. Für die lichtmikroskopisch sichtbare Querstreifung der Myofibrillen ist die unterschiedliche Lichtbrechung in ihrem Inneren unter polarisiertem Licht verantwortlich. Man unterscheidet die isotropen (einfachbrechenden) I-Streifen, die unter dem Mikroskop hell erscheinen und die anisotropen (doppelbrechenden) A-Streifen, die dunkel erscheinen. Diese Zonen sind durch die Anordnung von Aktin- und Myosinfilamenten wiederum in verschiedene Zonen eingeteilt. Zwischen zwei I-Streifen liegt der dunkel erscheinende Z-Streifen, an dem die dünnen Aktinfilamente durch Quervernetzung der Intermediärfilamente inserieren. Die Myosinfilamente sind dicker und überlagern sich in den A-Streifen mit den Aktinfilamenten. Da sich die Aktinfilamente von beiden Seiten zwischen die Myosinfilamente schieben, die Mitte des A-Streifens aber nicht erreichen, bleibt dort eine hellere Zone, der H-Streifen. In dessen Mitte sind die Myosinfilamente miteinander quervernetzt, wodurch wiederum ein dunkler Streifen, nämlich der H-Streifen, entsteht. Das Sarkomer hat einen charakteristischen Aufbau, der sich aus folgender Anordnung der Streifen ergibt: Z-I-A-H-M-H-A-I-Z (Ferrans und Thiedemann 1983, Sommer und Jennings 1986).

Die Volumendichte der Myofibrillen variiert, genau wie die der Mitochondrien, zwischen den einzelnen Spezies (Mensch 59%, Hund 63%, Ratte und Hamster 57%, Maus 49%), allerdings gibt es hier keine eindeutige Beziehung zur Körpermasse (Schaper et al. 1985). Das Epikard bildet als äußerste Schicht des Herzens das viszerale Blatt der Serosa des Perikards. Es besteht aus einem einschichtigen Plattenepithel und einer Schicht aus lockerem Bindegewebe, über die es mit dem Myokard verbunden ist (Canale et al. 1986).

1.1.2 Fein- und Ultrastruktur des Nervensystems des Herzens

Die kardiale Funktion wird durch das autonome (vegetative) Nervensystem des Herzens moduliert, welches sich aus dem sympathischen und parasympathischen System zusammensetzt (Vaseghi und Shivkumar 2008). Die Nervenzellen des Sympathikus und des Parasympathikus innervieren die Zellen des Erregungsbildungs- und -leitungssystems, sowie die Blutgefäße und das Arbeitsmyokard des Herzens.

Während der Sympathikus eine positiv inotrope (kontraktile), dromotrope (erregungsleitende), chronotrope (herzfrequenzsteigernde) und bathmotrope (reizschwellenhebende) Wirkung hat (Schümann 1983), beeinflusst der Parasympathikus diese Parameter negativ (Vaseghi und Shivkumar 2008). Sowohl die Kerngebiete des Sympathikus, als auch die des Parasympathikus liegen im zentralen Nervensystem: Die Kerngebiete (Perikaryen) des Parasympathikus liegen in der Medulla oblongata, dem hinteren Abschnitt des Hirnstamms, wo die Perikaryen zum größten Teil im ventralen und lateralen Teil des Nucleus ambiguus liegen, wobei sich einige Perikaryen auch im dorsalen motorischen Kern und der zwischen den beiden Kernen liegenden Region befinden (Hopkins und Amour 1984). Die Kerngebiete des Sympathikus liegen bei den meisten Säugetierspezies im thorakalen und lumbalen Abschnitt des Rückenmarks, beim Mensch auch in den letzten zervikalen Abschnitten (Norris et al. 1977). Von den Kerngebieten aus ziehen die Axone zu einem Ganglion (Nervenzellkörperansammlung), das entweder organfern oder -nah liegt. Dort wird über eine Synapse die Erregung auf ein postganglionäres Neuron umgeschaltet, dessen Axon dann die Erregung zum Herzen leitet. Die meisten präganglionären sympathischen Axone werden in den oberen (beim Tier kranialen) und mittleren zervikalen Ganglien oder in den Ganglia stellata umgeschaltet, einige aber auch erst in den mediastinalen Grenzstrangganglien oder in den Ganglienplexus im Herzen (Hopkins und Amour 1984). Die präganglionären Axone des Parasympathikus verlaufen mit dem N. vagus, zweigen sich dann von diesem als kleinere Äste ab und gelangen so zum Herzen, wo sie in den atrial oder ventrikulär gelegenen Ganglienplexus auf cholinerge postganglionäre Neurone umgeschaltet werden (Vaseghi und Shivkumar 2008, Amour 2008, Plecha et al. 1988). In einer mikroskopischen Studie konnten fünf Ganglienplexus in den beiden Vorhöfen und fünf im Fett der Herzbasis beider Ventrikel identifiziert werden (Amour et al. 1997).

Die Dichte der sympathischen Neurone ist in den Vorhöfen am größten, aber auch in den Ventrikeln gibt es ein sympathisches Netzwerk, das allerdings an der Herzbasis sehr viel dichter ist und zur Herzspitze hin abnimmt (Momose et al. 2001, Vaseghi und Shivkumar 2008). Die parasympathischen Neurone sind sehr unregelmäßig verteilt. Sie sind im Sinus- und AV-Knoten deutlich dichter lokalisiert als im umliegenden atrialen und ventrikulären Gewebe, wohingegen sie in den Ventrikeln nur spärlich zu finden sind

(Momose et al. 2001). Zusätzlich gibt es, wenn auch nur in geringer Anzahl, sensorische Axone, die zum Nervensystem des Herzens gehören (Momose et al. 2001).

Die Versorgung der Neurone wird durch die Gliazellen sichergestellt, welche sowohl stoffwechselaktive als auch stützende Funktion übernehmen. Die Perikaryen der Herzganglien werden von Satellitenzellen umhüllt, während die Axone von Schwannschen Zellen umgeben werden (Amour et al. 1997). Eine Schwannsche Zelle umschließt mit ihren zytoplasmatischen Fortsätzen oft mehrere Axone, wie es auf Abb. 1.1 zu sehen ist.

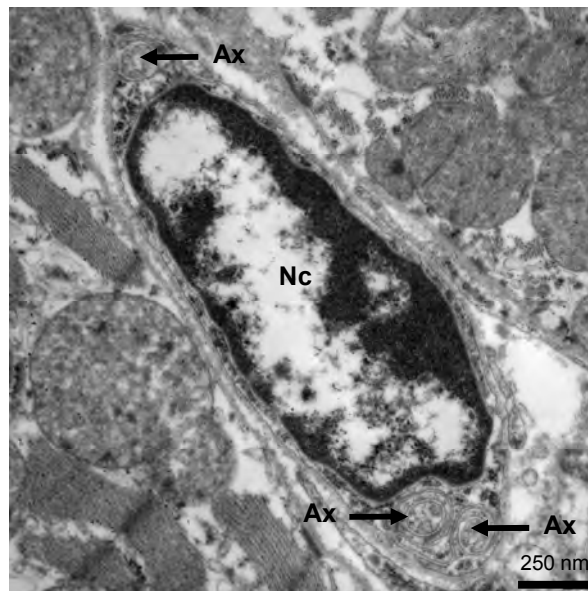


Abb 1.1: Schwannsche Zelle mit drei Axonen. Es ist deutlich erkennbar, dass die Axone von den zytoplasmatischen Fortsätzen der Zelle umhüllt werden. In der Mitte der Zelle befindet sich der relativ große Zellkern. Nc=Nucleus, Ax=Axon

Die sympathische Erregungsübertragung erfolgt über den Neurotransmitter Noradrenalin, in geringfügiger Menge auch über Adrenalin; aus der Aminosäure Tyrosin wird enzymatisch über Dihydroxyphenylalanin Dopamin synthetisiert, das in Speichervesikel verpackt und dort zu Noradrenalin bzw. Adrenalin umgewandelt wird (Vaseghi und Shivkumar 2008). Entlang den Enden der Axone befinden sich zahlreiche Auftreibungen, die sog. „Varikositäten“ (ca. 1-3 μm x 4 μm), in denen die Speichervesikel gelagert

werden und von wo aus sie bei Stimulation freigesetzt werden (Vaseghi und Shivkumar 2008). Der Neurotransmitter der parasympathischen Nervenfasern ist Acetylcholin, das im Zytosol der Nervenendigungen ebenfalls enzymatisch aus Cholin hergestellt und in Speichervesikeln aufbewahrt wird (Bennett und McLachlan 1972, Vaseghi und Shivkumar 2008).

In den sympathischen Neuronen werden zusätzlich auch Neuropeptide (im Herz vorwiegend Neuropeptid Y) synthetisiert. Dies erfolgt im Gegensatz zu den Neurotransmittern nicht enzymatisch, sondern ribosomal über das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat im Perikaryon (Hökfelt et al. 2003, Mühlfeld et al. 2011). In den sog. „large dense core“ Vesikeln (LDCV) werden die Neuropeptide gespeichert und anterograd zu den Enden des Axons oder aber in die Dendriten transportiert (Hökfelt et al. 2003), wobei ihre Freisetzung entweder an den Nervenenden, dendritisch oder vom Perikaryon aus erfolgen kann und die vor allem bei „burst“ oder „high frequency firing“ stattfindet (Hökfelt et al. 2003). Diese Vesikel stellen sich elektronenmikroskopisch als große, klar abgegrenzte und runde Strukturen dar (85-135 nm), die von einem hellen Rand umgeben sind (Yuan et al. 1993, Amour et al. 1996). Im Gegensatz dazu sind die Speichervesikel der Neurotransmitter kleiner (35-50 nm) und fast durchsichtig (Amour et al. 1996); Sie werden bei „low frequency“ Aktivität abgegeben (Hökfelt et al. 2003).

Bei Reizung der sympathischen Nervenfasern wird Noradrenalin durch Exozytose freigesetzt und bindet an die Rezeptoren, die in der Membran der Herzmuskelzelle lokalisiert sind. Am Herzen sind v. a. die β -Rezeptoren von großer Bedeutung, wobei die β_1 - und β_2 -Rezeptoren im Verhältnis 5:1 im Myokard von gesunden Menschen vorkommen (Vaseghi und Shivkumar 2008). α -Adrenorezeptoren sind überwiegend in Gefäßwänden lokalisiert; aber auch im ventrikulären Myokard machen sie immerhin einen Anteil von 15% der adrenergen Rezeptoren aus. Nach Bindung von Noradrenalin an den Rezeptor kommt es über einen „second messenger“ Mechanismus zum intrazellulären Anstieg von cAMP, was die Proteinkinase aktiviert, die wiederum eine Öffnung der Kalziumkanäle in der Plasmamembran bewirkt. Durch die Öffnung der Kanäle kommt es zum intrazellulären Kalziumanstieg und infolgedessen wird auch aus

dem Sarkoplasmatischen Retikulum Kalzium freigesetzt. Durch diesen Mechanismus des Kalziumanstiegs wird die Kontraktilität der Zelle beträchtlich gesteigert (Vaseghi und Shivkumar 2008).

Die Freisetzung von Acetylcholin bei parasympathischer Stimulation erfolgt ebenfalls über Exozytose und führt zur unmittelbaren Aktivierung der postsynaptischen muscarinergen Rezeptoren (überwiegend Typ M2). Die Aktivierung dieser Rezeptoren führt dazu, dass die Produktion von cAMP herabgesetzt wird und somit die Kontraktilität der Zelle, im Gegensatz zur Wirkung des Sympathikus, abnimmt (Vaseghi und Shivkumar 2008).

1.2 Literaturübersicht

1.2.1 Morphologische Veränderungen des Herzens bei Hyper- und Atrophie

1.2.1.1 Myokardzusammensetzung und Myozyten

Zwischen Adipositas und der Masse des linken Ventrikels wurde in zahlreichen Studien eine signifikante Korrelation festgestellt (Messerli et al. 1987, Abel ED et al. 2008, Framingham Herzstudie: Lauer et al. 2011, Ashrafian et al. 2011). Dazu kommt bei mehr als 87% der adipösen Patienten eine Zunahme der Wanddicke des linken Ventrikels (Abel ED et al. 2008) und es wurde ebenfalls eine erhöhte Masse des rechten Ventrikels festgestellt (Rider et al. 2010).

Im Gegensatz zu dieser nachweislich auftretenden Hypertrophie des Herzens bei Adipositas gibt es auch bezüglich Unterernährung einen signifikanten Zusammenhang zwischen Herz- und Körpergewicht: Bei Gewichtsverlust durch vollständigen Nahrungsentzug (Vandewoude et al. 1988), reduzierte Nahrungsaufnahme (Gut et al. 2003, Okashi et al. 2001) und aufgrund einer Proteinmangelernährung (Abel RM et al. 1979, Pissaia et al. 1980) wird eine mit Gewichtsverlust einhergehende Herzatrophie beschrieben. Vandewoude et al. (1988) gehen in Bezug auf vollständigen Nahrungsentzug von einer Gewichtsabnahme des Herzens in zwei Phasen aus, wobei das Herz anfangs sehr schnell Gewicht verliert, dann aber gegenüber dem Rest des Körpers

geschont wird, so dass das Verhältnis von Herz- und Körpergewicht kontinuierlich ansteigt und sich dann bei einem relativ hohen Wert stabilisiert und erst in der letzten Phase des Hungerns genauso atrophisch wird wie die anderen Organe.

Die ernährungsbedingte Zu- bzw. Abnahme des Körpergewichtes wirkt sich auch morphologisch auf die Zusammensetzung des Myokards und die intrazellulären Bestandteile der Kardiomyozyten aus.

In Verbindung mit Adipositas wird eine milde Hypertrophie der Myozyten beschrieben (Abel ED et al. 2008); bei Menschen mit unkomplizierter Adipositas, also ohne zusätzliche Komorbiditäten, wurde ein deutlich erhöhtes Volumen der Myozyten festgestellt (Tracy und Sander 2011) und bei einer fütterungsbedingten Herzhypertrophie bei Ratten hatte die Volumendichte der interstitiellen Kollagenfasern signifikant zugenommen (Leopoldo et al. 2010). Intrazellulär wurde bei fütterungsbedingter Adipositas bei Mäusen eine signifikante Reduktion der Volumendichte der Mitochondrien ermittelt (Dong et al. 2007), während eine Adipositas in Verbindung mit Diabetes mellitus mit einer erhöhten Anzahl an Mitochondrien einherging (Abel ED et al. 2008). Qualitativ wird bei ernährungsbedingter Hypertrophie vor allem eine vermehrte Fetteinlagerung (Christoffersen et al. 2003, Leopoldo et al. 2010) in den Myozyten beschrieben, wobei es auch Befunde zu chronischer Adipositas beim Menschen gibt, bei denen eine vermehrte Lipideinlagerung nicht festzustellen war (Amad et al. 1965). Da jedoch eine mögliche direkte Verbindung zwischen einer erhöhten Fetteinlagerung und der Dysfunktion des Herzens bei Adipositas besteht (Borradi und Schaffer, 2005, Nascimento et al. 2011), wird deren Bedeutung unter dem Begriff der Lipotoxizität stark diskutiert (Wende und Abel ED, 2010). Bei Ratten, die allein aufgrund einer fettreichen Fütterung starke Lipideinlagerungen aufwiesen, konnte jedoch keine kardiale Dysfunktion bestätigt werden (Nascimento et al. 2011). Erwähnenswert ist auch, dass man im hypertrophen Herzen nicht nur eine Größenzunahme der Myozyten gefunden hat, sondern auch eine Expression fetaler Gene (Kimura et al. 2007), die sowohl kontraktile Proteine (Mercadier et al. 1981), als auch Ionenkanäle (Tomaselli et al. 1999) und sekretorische Proteine betrifft (Ogawa et al. 1991, Kohno et al. 1994). Wie bereits eingangs beschrieben, wurde zwischen den einzelnen Tierspezies ein allometrischer Zusammenhang bezüglich des Körpergewichtes und der Volumendichte der

Mitochondrien und Myofibrillen festgestellt (Barth et al. 1992). Die Volumendichte der Mitochondrien war bei Tierspezies mit geringem Körpergewicht am kleinsten, während die Volumendichte der Myofibrillen keine Variabilität zwischen verschiedenen Tierspezies zeigte (Barth et al. 1992)

Bezüglich strukturellen Veränderungen des Herzens bei fütterungsbedingter Herzatrophie gibt es weniger quantitative Daten. Qualitativ wurden bei einer durch 50%ige Nahrungsreduktion hervorgerufenen Atrophie folgende fokal auftretende Veränderungen gefunden: ein reduzierter Anteil des Sarkoplasmas, Verlust oder Disorganisation der Myofilamente, zahlreiche polymorphe Mitochondrien und tiefe Einstülpungen der Plasmamembran (Okoshi et al. 2001). Eine durch vollständigen Nahrungsentzug induzierte Atrophie des Herzens war mit einer signifikant reduzierten Volumendichte der Myozyten und einem erhöhten Verhältnis von Mitochondrien zu Myofibrillen verbunden (Vandewoude und Buysens, 1992a). Proteinmangel und dadurch hervorgerufene Atrophie führte ebenfalls zu einer signifikant reduzierten Volumendichte der Myozyten (Pissaia et al. 1980). In Bezug auf Tumorimplantation und dadurch erzeugte Atrophie war dieses Verhältnis ebenfalls signifikant erhöht (Sjöström et al. 1987). Zusätzlich wurde bei tumorkachektischen Mäusen mit Herzatrophie eine signifikant reduzierte Volumendichte und ein signifikant reduziertes Volumen des Sarkoplasmas gefunden (Mühlfeld et al. 2011). Sowohl in Fällen von Anorexia nervosa, sowie bei Tumorkachexie wurde eine vermehrte Dichte an Lipofuszingranula evaluiert (Misliwetz et al. 1991, Burch et al. 1968), was normalerweise nur im Rahmen des Alterungsprozesses auftritt. Zusätzlich wurde bei Patienten mit Anorexia nervosa eine Zerstörung der Myofibrillen beschrieben (Schocken et al. 1989).

Bemerkenswert ist, dass die Zusammensetzung der kontraktilen Proteine auf Genebene und in Bezug auf den Plasmaspiegel bei tumorkachektischen Mäusen verändert ist (Tian et al. 2010), insbesondere die Genexpression von Troponin I, welches die Kontraktion des Herzmuskels steuert, war deutlich vermindert (Tian et al. 2010).

1.2.1.2 Kapillaren

Die morphologische Veränderung der versorgenden Kapillaren, wurde bezüglich einer fütterungsbedingten Herzhypertrophie bisher nicht untersucht. In Verbindung mit

Herzhypertrophie durch leichtes Training (Mattfeld et al. 1986) und Verabreichung von Thyroxin (Chilian et al. 1985) wurde eine Zunahme der Kapillarlänge und somit eine unveränderte Diffusionsstrecke für Metaboliten ermittelt, wohingegen bei Hypertrophie aufgrund von hartem Training (Anversa et al. 1985) und chronischem Bluthochdruck (Breisch et al. 1980) die Kapillardichte deutlich reduziert und dadurch die Diffusionsstrecke erhöht war.

Morphologische Veränderungen der Kapillaren bei Atrophie des Herzens wurden bei vollständigem Nahrungsentzug an Ratten untersucht, wobei eine erhöhte Kapillardichte bei gleichzeitig reduzierter Querschnittsfläche des Kapillarlumens und eine reduzierte Diffusionsstrecke für Metaboliten ermittelt wurden (Vandewoude und Buysens 1992b). Eine signifikant erhöhte Kapillardichte wurde auch bei durch Nicht-Belastung des Herzens induzierter Atrophie gefunden (Rakusan et al. 1997).

1.2.1.3 Innervation

Morphologische Veränderungen des Nervensystems am Herzen wurden bisher nur an Modellen durchgeführt, deren Hyper- oder Atrophie nicht ernährungsbedingt entstanden ist, und auch dort nur sehr spärlich. Bemerkenswert sind die Befunde einer Studie an Ratten, bei der durch Behandlung mit Monokrotalin ein pulmonarer Bluthochdruck (Lame et al. 2000) erzeugt wurde, der zu einer Hypertrophie des rechten Ventrikels führte. Dies bewirkte eine morphologische Hyperinnervation mit sympathischen Fasern und gleichzeitig einen Rückgang der neuronalen Zellfunktion, d.h. die Dichte der Nervenfasern wurde höher, ihre Aktivität war dafür aber herabgesetzt (Kimura et al. 2006). Bei einer morphologischen Untersuchung des Nervensystems bei Mäusen im Zusammenhang mit einer durch Tumorkachexie entstandenen Atrophie des Herzens, wurde die Länge der gesamten kardialen Nervenfasern ermittelt und bei den tumorkachektischen Mäusen eine deutliche Verkürzung der Fasern festgestellt (Mühlfeld et al. 2011).

1.2.2 Funktionelle Störungen des Herzens durch Hyper- und Atrophie

1.2.2.1 Herzfunktion

Adipositas gilt als ein selbstständiger pathogener Risikofaktor in der Entstehung von Kardiomyopathie und Herzinsuffizienz beim Mensch (Kenchaiah et al. 2002).

In Deutschland waren im Jahr 2009 51% der Erwachsenen übergewichtig und 14% adipös, wovon wiederum 14% Frauen und 16% Männer waren (www.destatis.de).

Das Körpergewicht von adipösen Menschen ist signifikant korreliert mit einer diastolischen Dysfunktion (Harmancey et al. 2008, Alpert et al. 2001). Häufig wird auch eine mit Adipositas einhergehende kontraktile Dysfunktion beschrieben, die möglicherweise im Zusammenhang mit einer erhöhten Sekretion von Adipokinen aus dem Fettgewebe steht (Lamounier-Zepter et al. 2009, Ouwens et al. 2010, Look et al. 2010). Von großer Bedeutung ist die hohe Assoziation von Adipositas mit der Entstehung des metabolischen Syndroms (Després 2006), welches Adipositas, eine verminderte Konzentration des HDL-Cholesterols („high-density lipoprotein cholesterol“), eine erhöhte Konzentration an Triglyzeriden, erhöhten Blutdruck und Hyperglykämie mit einschließt (Magliano et al. 2006). Es wurde festgestellt, dass bei bestehender Adipositas ein Risiko von 70,8% besteht, an Diabetes mellitus Typ 2 zu erkranken und ein Risiko von 20,3% besteht, Bluthochdruck zu entwickeln (Hwang et al. 2006). Weitere mit Adipositas assoziierte Funktionsstörungen des Herzens sind das Auftreten von Vorhofflimmern (Watanabe et al. 2008) und ventrikulären Extrasystolen (Messerli et al. 1987). Zudem besteht für adipöse Patienten ein doppeltes Risiko eines frühzeitigen Todes und das fünffache Risiko, an Kardiovaskulären Erkrankungen zu sterben, im Vergleich zu Normalgewichtigen (Poirier et al. 2004).

Auch bei Haustieren spielt Adipositas eine immer größere Rolle, wobei sie meist eine Folge von falscher Fütterung und/oder Bewegungsmangel darstellt (German 2006). Die hieraus resultierende positive Energiebalance (Burkholder und Toll 2000) ist die wichtigste Ursache, neben anderen Faktoren wie Kastration (Hoenig und Ferguson 2002), Schilddrüsen- oder Nebennierenüberfunktion, Medikamenten (German 2006) und rassespezifischer Prädisposition (z. B. Labrador Retriever, Edney und Smith 1986).

Typische mit Adipositas assoziierte Erkrankungen sind metabolische und endokrine Störungen, orthopädische und kardiorespiratorische Erkrankungen, Erkrankungen des Urogenitaltraktes, Neoplasien und funktionelle Beeinträchtigungen wie erhöhtes Narkoserisiko aufgrund von Dyspnoe (German 2006). Anhand von Studien in mehreren Teilen der Welt wurde die Inzidenz von Adipositas in der Hundepopulation auf ca. 22% bis 40% geschätzt (McGreevy et al. 2005), wobei in der Katzenpopulation eine ähnliche Inzidenz besteht (Scarlett et al. 1994).

Über funktionelle Störungen des Herzens bei fütterungsbedingter Atrophie ist nicht ganz so viel bekannt wie bei der ernährungsbedingten Hypertrophie des Herzens. Die meisten Studien sind im Hinblick auf Tumorkachexie und Anorexia nervosa durchgeführt worden. Bei Anorexia nervosa kommt es sowohl zu einer systolischen als auch zu einer diastolischen Dysfunktion (Schocken et al. 1989), wobei die systolische Dysfunktion mit einer reduzierten Masse und Füllung des linken Ventrikels assoziiert ist (de Simone et al. 1994b). Weitere funktionelle Beeinträchtigungen bezüglich Atrophie bei Anorexia nervosa sind ein Mitralklappenprolaps (Goldberg et al. 1988, Schocken et al. 1989), bzw. eine unregelmäßige Bewegung der Mitralklappe (de Simone et al. 1994b), sowie das Auftreten von Herzrhythmusstörungen (Schocken et al. 1989) und plötzlichem Herztod (Misliwetz et al. 1991).

Die wachsenden Zahlen der adipösen Menschen sind leider kein Indiz dafür, dass die Zahl der unterernährten Menschen abnimmt. Vor allem die Menschen in armen Ländern leiden immer noch an Unterernährung. Laut der food and agriculture organization (FAO) leiden fast 30% der Weltbevölkerung unter irgendeiner Form von Unterernährung (www.fao.org.com). In den Entwicklungsländern ist jeder fünfte Einwohner chronisch unterernährt, was einer Anzahl von 777 Millionen Menschen entspricht und 55% der Sterbefälle bei Kindern werden auf Unterernährung zurückgeführt (www.fao.org.com).

1.2.2.2 Funktion des autonomen Nervensystems

Zu funktionellen Störungen des autonomen Nervensystems des Herzens gibt es einige Veröffentlichungen in direktem Zusammenhang mit ernährungsbedingter Hyper- und Atrophie. Bei normalgewichtigen weiblichen Ratten, die mit sehr fettreichem Futter

gefüttert wurden, kam es zu einer sympathischen Hyperinnervation, obwohl keine signifikante Gewichtszunahme und kein erhöhter Lipid-Plasmaspiegel festgestellt worden waren (Aubin et al. 2010). Auch eine parasympathische Dysfunktion wird bei übergewichtigen, aber nicht an Diabetes mellitus erkrankten Menschen beschrieben, wobei festgestellt wurde, dass die kardiale parasympathische Dysfunktion mit einem erhöhten Kohlenhydratanteil und geringem Fett- und Proteinanteil in der Nahrung assoziiert ist (Valensi et al. 2005). Einen direkten Vergleich der Aktivität des autonomen Nervensystems lieferte eine Studie, bei der normalgewichtige Erwachsene unter standardisierten Bedingungen 10% an Gewicht ab- bzw. zunahmen, was bezüglich einer Gewichtsabnahme einen signifikant reduzierten sympathischen Einfluss und eine Zunahme des parasympathischen Einflusses zur Folge hatte (Aronne et al. 1995). Bei den Probanden mit Gewichtszunahme war dieses veränderte Verhältnis genau umgekehrt (Aronne et al. 1995). In einer anderen Studie an Patienten mit Anorexia nervosa war die sympathische Kontrolle sehr unausgeglichen und es wurde ebenfalls eine vagale Hyperaktivität festgestellt (Murialdo et al. 2007).

1.3 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die Vermutung, dass es im Zusammenhang mit ernährungsbedingt hervorgerufener Hyper- und Atrophie des Herzens zu morphologischen Veränderungen der Herzmuskelzellen kommt, wurde bereits in zahlreichen Studien untersucht und auch bestätigt. Hinsichtlich morphologischer Veränderungen der Kapillaren wurden ebenfalls morphologische Veränderungen bei Hyper- und Atrophie des Herzens gefunden, allerdings beziehen sich diese Daten nur eingeschränkt auf die fütterungsbedingt hervorgerufene Form von Hyper- und Atrophie. Lediglich im Zusammenhang mit vollständigem Nahrungsentzug liegen quantitative Daten zu den Kapillaren bei Herzatrophie vor (Vandewoude 1995). Bezüglich der Innervation des Herzens bei Hyper- und Atrophie wurde in einigen Studien eine funktionelle Beeinträchtigung des autonomen Nervensystems festgestellt. Inwiefern diese funktionelle Störung mit morphologischen

Veränderungen der Innervation einhergeht, wurde bisher sehr unzureichend untersucht. Bei einer bereits erwähnten Studie an Ratten mit durch Bluthochdruck erzeugtem hypertrophem rechten Ventrikel wurde morphologisch eine Hyperinnervation der Myozyten mit sympathischen Nervenfasern (Kimura et al. 2006) und bei einer morphologischen Untersuchung des Nervensystems bei Mäusen mit atrophischem Herzen aufgrund von Tumorkachexie eine Verkürzung der Gesamtlänge der kardialen Nervenfasern festgestellt (Mühlfeld et al. 2011).

Ziel der vorliegenden Studie war es, verschiedene Kompartimente des linken Ventrikels im Zusammenhang mit ernährungsbedingter Hyper- und Atrophie strukturell zu charakterisieren. Dabei wurde die Innervation bezüglich ernährungsbedingter Hyper- und Atrophie des Herzens zum ersten Mal quantitativ erfasst und ebenso wurden erstmalig die drei Kompartimente Kardiomyozyten, Kapillaren und Innervation in Bezug zueinander gesetzt. Die Daten wurden licht- und elektronenmikroskopisch unter Anwendung der Stereologie erhoben.

Im Einzelnen wurden hierzu folgende Parameter ermittelt:

- Das Volumen der Myozyten und ihrer Organellen
- Die Gesamtlänge der Kapillaren
- Die Gesamtlänge der Axone

2. Material und Methoden

2.1 Tiermodelle und Gewebepreparation

2.1.1 Tiermodelle

Bei den untersuchten Proben handelt es sich um Herzmuskulatur von Mäusen. Die Proben stammen von zwei Tiergruppen unterschiedlicher Herkunft und der jeweils dazugehörigen Kontrollgruppe. Bei der einen Tiergruppe handelt es sich um Mäuse, die fütterungsbedingt eine Adipositas und infolgedessen eine Hypertrophie des Herzens entwickelt haben. Die andere Tiergruppe besteht aus Mäusen, die durch Reduzierung des Futters um die Hälfte einen signifikanten Gewichtsverlust erlitten, so dass es zu einer Atrophie des Herzens kam.

Adipositas

Die erste Gruppe bestand aus zehn männlichen C57BL/6-Mäusen, die bei Charles River (Sulzfeld, Deutschland) gekauft und im Alter von etwa neun Wochen zufällig einer Kontrollgruppe (KG) oder einer Adipositasgruppe (AP) zugeordnet wurden. Der Tierversuch wurde in Kooperation mit Prof. Dr. Ingrid Fleming vom Institut für Physiologie der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt durchgeführt.

Die Tiere der Kontrollgruppe wurden mit Standardfutter (Anteil am Gesamtkaloriengehalt: Protein 20%, Fett 5% und Kohlenhydrate 75%) gefüttert, während die der Adipositas-Gruppe ein hochkalorienhaltiges Futter erhielten, das sowohl einen hohen Fett- als auch hohen Kohlenhydratgehalt hatte (Anteil am Gesamtkaloriengehalt: Protein 15%, Fett 42% und Kohlenhydrate 43%, Teklad diet TD.03584, Harlan Laboratories). Die Fütterung erfolgte bei beiden Gruppen ad libitum über einen Zeitraum von 28 Wochen, wobei alle Tiere stets freien Zugang zu Wasser hatten und bei einem hell/dunkel- Rhythmus von 12 Stunden gehalten wurden.

Vor der Tötung wurde das Lebendgewicht bestimmt (s. Tab. 2.1) und zusätzlich ein intraperitonealer Glucose Toleranztest nach dem Standardprotokoll von ‚Animal models of Diabetic Complications Consortium‘ durchgeführt, um auszuschließen, dass die Tiere

an Diabetes mellitus erkrankt waren. Hierzu wurde allen Tieren (incl. den Kontrolltieren) für sechs Stunden das Futter entzogen, anschließend wurden sie gewogen und nach sechs weiteren Stunden des Hungerns wurde anhand von venösem Blut der Blutglucosespiegel bestimmt (Accu Check[®]). Anschließend wurde den Tieren 10 µl/g Körpergewicht einer 10% Glucoselösung intraperitoneal injiziert und nach jeweils 30, 60 und 120 Minuten der Blutglucosespiegel erneut erfasst. Wie aus der untenstehenden Tabelle zu entnehmen ist, liegen keine Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe vor und somit ist davon auszugehen, dass die Tiere zum Zeitpunkt der Tötung nicht an Diabetes mellitus erkrankt waren (Abb. 2.1).

Die Tiere wurden durch Inhalation mit Isofluran anästhesiert und durch einen anschließenden Genickbruch getötet.

Tab. 2.1: Körpergewicht und Gewicht des linken Ventrikels der Tiere der Adipositasgruppe und der dazugehörigen Kontrollgruppe. Als Signifikanzgrenze für den Unterschied zwischen den beiden Gruppen wurde $p < 0,05$ festgelegt.

	KG n=5	AG n=5	p-Wert
Körpergewicht [g]	31,6 ± 1,7	51,2 ± 1,9	0,009
Gewicht des linken Ventrikels [mg]	101,76 ± 7,89	118,86 ± 6,11	0,009
Gewicht li Ventrikel/ Körpergewicht [%]	0,32 ± 0,03	0,23 ± 0,01	0,009

KG= Kontrollgruppe, AG= Adipositasgruppe.

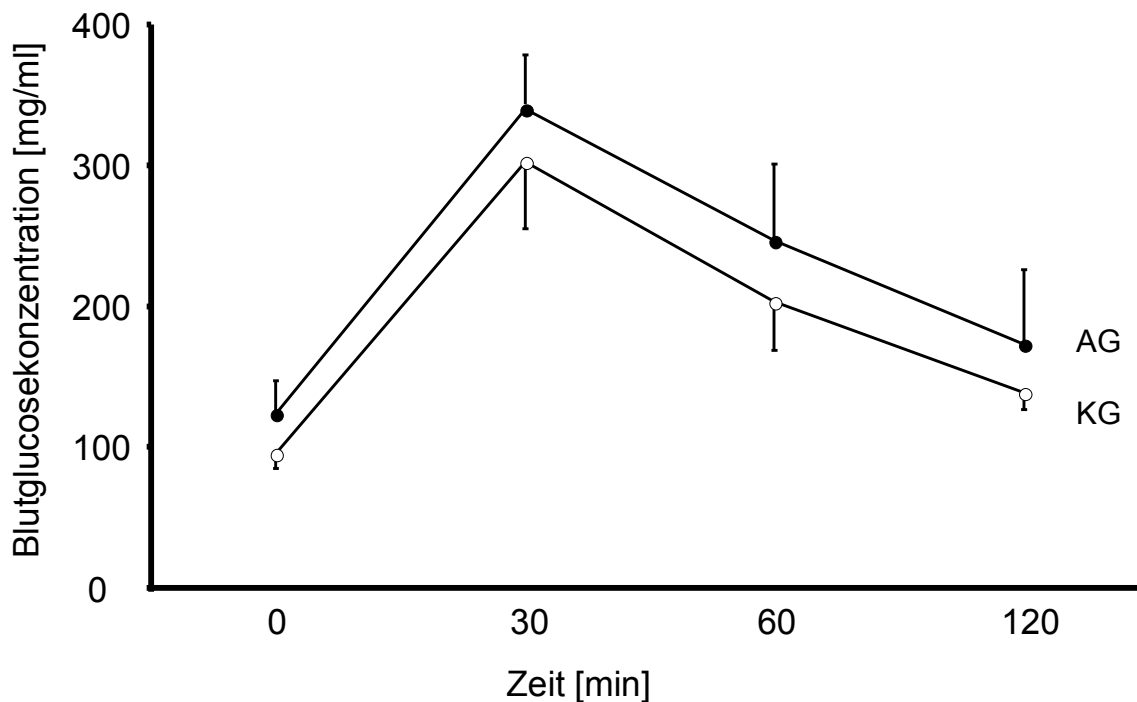


Abb. 2.1: Verlauf des Blutglucosespiegels bei den Tieren der Adipositas- und der Kontrollgruppe in Abhängigkeit von der Zeit. Die Abbildung zeigt, dass es keinen signifikanten Unterschied bezüglich des Blutglucosespiegels im Vergleich der beiden Gruppen gab, der Abbau erfolgte ungefähr im gleichen Zeitraum.

Unterernährung

Zehn männliche C57BL/6-Mäuse wurden ebenfalls bei Charles River (Sulzfeld, Deutschland) gekauft und in eine Kontroll- (KG) und eine Unterernährungsgruppe (UG) eingeteilt. Der Tierversuch wurde in Kooperation mit Dr. med. Robert Voswinckel vom Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung Bad Nauheim (Deutschland), Abteilung für Entwicklung und Umbau der Lunge, durchgeführt. Beide Tiergruppen wurden in Einzelkäfigen bei einem hell/dunkel- Rhythmus von 12 Stunden gehalten, ad libitum mit Standardfutter gefüttert und hatten ständig freien Zugang zu Wasser. Die täglich aufgenommene Futtermenge wurde gemessen und notiert, bevor die Tiere im Alter von acht Wochen gewogen wurden und der Tierversuch begann. Ab diesem Zeitpunkt erhielten die Tiere der Unterernährungsgruppe nur noch 50% der gewöhnlich

aufgenommenen Tagesration an Futter, der Zugang zu Wasser war weiterhin jederzeit möglich. Die reduzierte Futtermenge wurde auf zwei Portionen pro Tag aufgeteilt, so dass die Tiere der Unterernährungsgruppe diese im Abstand von 10-12 Stunden morgens und abends erhielten. Nach sieben Tagen dieser reduzierten Fütterung wurden alle Tiere erneut gewogen und anschließend durch Inhalation mit Isofluran und Genickbruch getötet und ausgeblutet.

Tab. 2.2: Körpergewicht und Gewicht des linken Ventrikels der Tiere der Unterernährungs- und der dazugehörigen Kontrollgruppe. Als Signifikanzgrenze für den Unterschied zwischen den beiden Gruppen wurde $p < 0,05$ festgelegt.

	KG n=5	UG n=5	p-Wert
Körpergewicht [g]	24,88 ± 1,14	16,82 ± 1,25	0,009
Gewicht des linken Ventrikels [mg]	94,64 ± 16,13	72,2 ± 8,96	0,016
Gewicht li Ventrikel/ Körpergewicht [%]	3,87 ± 0,50	4,32 ± 0,69	0,346

KG= Kontrollgruppe, UG= Unterernährungsgruppe

2.1.2 Vorbereitung der Herzen für die Gewebeeinbettung und die Mikroskopie

Die Herzen der Tiere wurden unmittelbar nach dem Töten per Sternotomie entnommen und durch Einlegen in eine Paraformaldehyd-Lösung fixiert (4% Paraformaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer). Die Fixierung erfolgte für mindestens 24 Stunden bei 4°C. Anschließend wurden die Vorhöfe vorsichtig von den Herzkammern getrennt, in Phosphatpuffer gewaschen und dann in 2,3 M Saccharose inkubiert. Die Vorhöfe wurden eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Die Herzkammern wurden gewogen und der linke Ventrikel einschließlich des Septum interventriculare von der freien Wand des rechten Ventrikels getrennt und gewogen. Von jedem Tier wurde die linke Kammer einschließlich des Septum interventriculare einmal längs und dreimal quer geschnitten, so dass pro Tier acht Probeblöckchen vorlagen, wovon wiederum vier mit Hilfe des „systematic uniform random samplings“ ausgewählt wurden (Mayhew TM 1991), d. h. das erste Probestück wurde zufällig ausgewählt, unabhängig davon, welcher Region des linken Ventrikels es entstammte, und dann wurden die anderen drei im zick-zack-Muster nacheinander ausgewählt. Somit war sichergestellt, dass jede Region des Ventrikels die gleiche Chance hatte, in die Auswertung einzugehen. Da das Herzmuskelgewebe anisotrop ist, musste es vor der Gewebeeinbettung zunächst disorientiert werden, was mit Hilfe des „isectors“ (Nyengaard und Gundersen 1992) gemacht wurde. Die Proben wurden mit Hilfe von Agarose (5%) in eine Silikonform mit kugeligen Aushöhlungen (Durchmesser 4 mm) eingebettet, möglichst so, dass die Proben zentral im Material lagen und vollständig von diesem umgeben waren. Nach einigen Minuten war die Agarose fest und die Proben, die sich nun in einer Agarosekugel befanden, konnten ausgeblockt werden. Die erhaltenen Kugeln wurden nun auf einer ebenen Fläche gerollt, zufällig gestoppt und in dieser Position in Paraffin eingebettet. So war gewährleistet, dass die davon angefertigten Schnitte isotrop waren. Verwendet wurden diese Proben um mittels Immunhistochemie die Nervenfasern zu quantifizieren.

Von den anderen vier gewonnenen Gewebeblöckchen wurde je ein Blöckchen zufällig ausgewählt, gewogen und separat in einem Paraffinblöckchen eingebettet. Dieses Blöckchen wurde für die Bestimmung der Gewebeschrumpfung in Paraffin verwendet, um die Länge der Nervenfasern dementsprechend korrigieren zu können.

Die letzten drei Gewebeblöckchen wurden zur besseren Strukturhaltung für 24 Stunden in eine Fixationslösung aus 1,5% Glutaraldehyd und 1,5% Paraformaldehyd in 0,15 M Hepes-Puffer eingelegt. Um auch hier isotrope Proben zu erhalten, wurde der „orientator“ (Mattfeldt et al. 1990) verwendet. Die Proben wurden dazu auf einen Kreis gelegt, der eine gleichmäßige, aber spiegelverkehrte Skalierung mit Zahlen von 1 bis 90 besaß, so dass jeder Zahl stets dieselbe Zahl gegenüberlag. Es wurde dann zufällig eine

Zahl gewählt und das Probenblöckchen dieser Zahl entsprechend so geschnitten, dass die Schnittlinie eine Gerade durch die beiden sich gegenüberliegenden Zahlen bildete. Die gewonnene Schnittfläche wurde nun nach unten auf einen Kreis gelegt, der nach der Cosinusfunktion eingeteilt ist. Wiederum wurde eine Zufallszahl gewählt und das Herz gemäß der Zahl in entsprechendem Winkel geschnitten. Die nun entstandene Schnittfläche ist isotrop in drei Dimensionen und somit ist gewährleistet, dass alle Schnitte, die man hieraus anfertigt, ebenso isotrop sind (Mühlfeld et al. 2010a). Anschließend wurden diese isotropen Proben in Epon eingebettet.

2.2 Gewebeeinbettung

2.2.1. Eponeinbettung

Zunächst wurden die Proben fünf Mal für je fünf Minuten in 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen und anschließend für zwei Stunden in 1% Osmiumtetroxid inkubiert (bei Raumtemperatur). Anschließend wurden die Proben in destilliertem Wasser gewaschen und danach für 16 Stunden bei 4°C in halbgesättigtem Uranylacetat kontrastiert. Da das Uranylacetat bei Lichteinfluss leicht seine Stabilität und damit seine Wirkung verliert, wurde die Inkubation im Dunkeln durchgeführt. Nach erneutem Waschen wurden die Proben durch Einlegen in eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert; die erste Stufe war 30%iges Ethanol, die letzte 100%iges Ethanol. Die Proben wurden jeweils zweimal hintereinander für je fünf Minuten in derselben Konzentration inkubiert, bevor sie in die nächsthöhere Konzentration gegeben wurden. Nach Inkubation (ebenfalls fünf Minuten) in einem 1:1 Gemisch aus 100%igem Ethanol und Propylenoxid, wurden die Proben zweimal für jeweils fünf Minuten in pures Propylenoxid eingelegt. Es folgte eine 30minütige Inkubation in einem 1:1 Gemisch aus Propylenoxid und Epon, danach für 16 Stunden in purem Epon. Abschließend wurden die Proben in frischem Epon eingebettet und zum Aushärten für 16 Stunden in den Wärmeschrank (60°C) gestellt.

Aus den hieraus gewonnenen Probenblöckchen wurden Ultradünnschnitte (etwa 70 nm) für die Auswertung mit dem Transmissionselektronenmikroskop und Semidünnschnitte

(0,75 µm) für die lichtmikroskopische Auswertung angefertigt. Vor dem Schneiden wurden die Eponblöckchen getrimmt. Hierfür wurden diese in eine Trimmmaschine (TM 60, Reichert, München, Deutschland) eingespannt und mit Hilfe eines Diamantenschleifers pyramidenförmig auf die geeignete Schnittgröße des Blöckchens zurechtgeschliffen. Für das Schneiden der Proben wurde ein Ultramikrotom (Reichert Ultracut E, Leica, Wetzlar, Deutschland) verwendet. Die Schnitte wurden direkt von der Messerkante auf einen Wassertropfen gegeben und von dort aus wurden die Ultradünnschnitte auf einen 200 mesh Nickel-Grid (Firma Plano EM, Wetzlar, Deutschland) aufgezogen und bei 60°C auf der Wärmeplatte getrocknet. Die Semidünnschnitte wurden vom Wassertropfen aus mit Hilfe einer Glaspipette auf einen Objektträger aufgezogen und nach dem Trocknen (Wärmeplatte 60°C) mit Methylenblau gefärbt.

2.2.2 Paraffin-Einbettung

Zu Beginn der Einbettung wurden die Proben fünf Mal in 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen (jeweils einige Minuten).

Anschließend folgten nacheinander einige Inkubationen Ethanol (verschiedene Konzentrationen, DMP (Dimethoxypropan), Paraffinöl und reinem Paraffin, sowie in Gemischen aus diesen Substanzen. Pro Substanz/Gemisch wurden zwei Inkubationen durchgeführt, zwischen denen die Substanz/das Gemisch erneuert wurde. Der genaue Verlauf und die Inkubationszeiten sind der Tabelle 2.3 zu entnehmen.

Tab. 2.3: Paraffineinbettung: Substanzen und Zeiträume der Inkubation

Substanz/Gemisch	Inkubationszeit (vor u. nach Wechsel des Substanzgemisches)
50% Ethanol	4 h und 16 h
70% Ethanol	4 h und 64 h
70% Ethanol+DMP (1:1)	4 h und 16 h

DMP	4 h und 64 h
DMP+Paraffinöl	4 h und 16 h
Paraffinöl	4 h und 64 h
Paraffinöl+Paraffin 42°C	4 h und 16 h
Paraffin 42°C	2 h und 16 h
Paraffin 56°C	2 h und 16 h

Nach dem letzten Inkubationsschritt wurden die Probenblöckchen zusammen mit dem 56°C heißen Paraffin in quadratische Eiswürfelformen gegeben und diese auf Eis gestellt, so dass das Paraffin fest wurde und die fertigen Paraffinblöckchen ausgeblockt werden konnten.

Für die Quantifizierung der Nervenfasern wurden 7 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt. Verwendet wurde ein Schlittenmikrotom (Typ 20249 der Jung AG Heidelberg). Die Schnitte wurden auf einen großen Tropfen destilliertes Wasser auf den Objektträger aufgebracht, wobei dieser solange auf der Wärmeplatte bei ca. 30°C blieb, bis das Wasser komplett verdunstet war. Anschließend wurden die Schnitte für 16 Stunden im Wärmeschrank bei 37°C aufbewahrt und dann bis zu ihrer weiteren Verwendung dunkel und trocken aufbewahrt.

Für die Bestimmung der Gewebeschrumpfung wurden die Probenblöckchen komplett aufgeschnitten. Nach dem Trocknen wurden die Objektträger mit den Schnitten zum Entparaffinieren für jeweils ca. 3-5 Minuten in Xylol und dann nacheinander in 100%, 96%, 80% und 70% Alkohol gestellt (absteigende Alkoholreihe). Anschließend wurden sie für dieselbe Zeit in destilliertes Wasser gestellt. Zur besseren Darstellung der Proben wurden die Schnitte mit Richardsonblau-Lösung angefärbt. Dazu wurden sie zehn Minuten lang in der Färbelösung inkubiert. Nach anschließendem zweimaligem Waschen in destilliertem Wasser wurden die Schnitte erneut nacheinander für 3-5 Minuten in 70%, 96%, 100% Alkohol (aufsteigende Alkoholreihe) und zuletzt in Xylol gestellt. Zum Schluss erfolgte das Eindecken mit einem Deckgläschen; als Eindeckmittel wurde Entellan[®] verwendet.

2.2.3 Gefriereinbettung

Die Vorhöfe wurden wie bereits erwähnt bei -80°C eingefroren. Dazu wurde auf ein Filterpapier Tissue-Tek[®] gegeben, eine Substanz, die die Gewebestruktur beim Einfrieren schützt. Das Filterpapier wurde für kurze Zeit in flüssigen Stickstoff (-80°C) gehalten, bis das Tissue-Tek[®] leicht angefroren war. Darauf wurde der Vorhof gelegt und dieser mit Tissue-Tek[®] bedeckt, so dass er vollständig darin eingebettet war. Das Filterpapier wurde erneut in den flüssigen Stickstoff getaucht, bis das Tissue-Tek[®] fest geworden war und die Proben bei -80°C eingefroren werden konnten.

Für die Quantifizierung der sympathischen und parasympathischen Nervenfasern wurden aus diesen Vorhöfen Gefrierschnitte angefertigt. Verwendet wurde hierfür ein Kryostat (CM1900 von Leica, Bensheim, Deutschland). Die Schnitte wurden $10\ \mu\text{m}$ dick geschnitten, anschließend eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet und dann bis zur eigentlichen Verwendung bei -22°C eingefroren. Pro Objektträger wurden ca. 2-3 Schnitte angefertigt. Zu beachten ist hierbei, dass die Schnitte nur ca. zwei Wochen lang für eine Immunhistochemie verwendet werden können. Zu einem späteren Zeitpunkt ist eine einwandfreie Gewebestruktur, die den Erfolg und die Qualität der Immunreaktion maßgeblich mitbestimmt, nicht mehr gewährleistet.

2.3 Methoden zur Auswertung der einzelnen Parameter

2.3.1 Immunhistochemie

2.3.1.1 Immunperoxidase- Verfahren

Hierfür wurden die wie oben bereits beschrieben angefertigten Paraffinschnitte verwendet.

Die Axone wurden hierbei mittels einer immunhistochemischen Markierung des panneuronalen Markers PGP 9.5 dargestellt (Gulbenkian et al. 1987). Nach dem Entparaffinieren (s. S. 23) und einer kurzen Zeit in destilliertem Wasser wurden die Proben in ein Gemisch aus Methanol und Wasserstoffperoxid gestellt (Verhältnis 99:1).

Dieser Schritt diente der Hemmung der endogenen Peroxidase. Zur nun folgenden Demaskierung wurden die Schnitte in 10 mM Zitronensäure (pH 6,0) gestellt und bei 800 Watt in der Mikrowelle so lange erhitzt, bis sichtbar Luftblasen aufstiegen. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Proben für 5 min in der Mikrowelle weitergekocht und evtl. verdampfte Zitronensäure wurde nachgefüllt. Es folgte ein weiteres Kochen für 5 Minuten. Nachdem die Schnitte 15 min bei Raumtemperatur abgekühlt waren, wurden sie für 10 min in PBS und weitere 10 min in PBS plus 0,1% Triton X inkubiert. Dieses Detergenz wurde verwendet, um die Zellmembranen zu permeabilisieren. Anschließend wurden die Schnitte zum Waschen für 10 min in phosphatgepufferte Salzlösung (PBS = „phosphate buffered saline“) gestellt und im Anschluss daran die Flüssigkeit von den Objektträgern abgesaugt und die Schnitte durch einen Fettstift markiert. Unmittelbar wurde nun eine Blocklösung (5% normal goat serum plus, NGS, plus 5% bovine serum albumine, BSA, in PBS gelöst) aufgetragen, die die unspezifischen Bindungsstellen blockieren sollte. Nach einer Stunde Inkubation wurde die Blocklösung abgesaugt und der Primäantikörper rabbit- α -PGP 9.5 (Verdünnung 1:4.000) aufgetragen, mit dem für 16 Stunden inkubiert wurde.

Als Sekundäantikörper wurde der swine-anti-rabbit Ig HRP Antikörper (Verdünnung 1:100) verwendet, an den das Enzym Peroxidase gekoppelt war. Dieser Antikörper wurde nach dreimaligem Waschen in PBS (jeweils 10 min) auf die Schnitte gegeben und für eine Stunde im Dunkeln inkubiert. Hiernach wurden die Schnitte einmal in PBS und zweimal in Tris-HCl für jeweils 10 min gewaschen. Das Sichtbarmachen der Immunreaktion erfolgte durch die DAB-Reaktion (3,3',4,4'-Tetraaminobiphenyltetrahydrochlorid). Zuerst wurden die Präparate in einem DAB-Gemisch für kurze Zeit inkubiert, damit sich die für die Farbreaktion erforderlichen Enzym-Substrat-Komplexe aus Peroxidase und DAB bilden konnten. Durch Zugabe von Wasserstoffperoxid wurde die eigentliche Reaktion dann gestartet.

Diese Reaktion muss im Dunkeln durchgeführt werden, da sonst die Stabilität des DABs verloren geht und somit die Farbreaktion unter Umständen nicht stattfindet. Um die Färbung zu erhalten, wurden alle weiteren Schritte und auch die Lagerung im Dunkeln vorgenommen.

Für die Vorinkubation, die zehn Minuten dauerte, wurde ein Gemisch aus Tris-HCL und DAB im Verhältnis 100:1,25 hergestellt. Um die Farbreaktion zusätzlich zu verstärken, wurde Nickelammoniumsulfat (1,5%) zugegeben. Es folgte eine Inkubation der Schnitte für 45 Minuten in demselben Gemisch, dem zusätzlich noch 30%iger Wasserstoffperoxid zugegeben wurde, so dass die Lösung eine Konzentration von 0,008% Wasserstoffperoxid besaß. Nach anschließend erneutem zweimaligem Waschen in Tris-HCl und Nachfixieren in 4% Paraformaldehyd für jeweils 10 min folgte das Dehydrieren durch die aufsteigende Alkoholreihe (70%, 96% und 100% Ethanol) und Xylol. Abschließend wurden die Schnitte mit Entellan[®] eingedeckt und mit einem Deckgläschen abgedichtet.

2.3.1.2 Immunfluoreszenz

Zur Darstellung der unterschiedlichen Nervenfasern wurden die wie oben beschrieben hergestellten Kryostatschnitte der Vorhöfe verwendet. Pro Tier wurde jeweils ein Objektträger mit ca. 2-3 Schnitten für die Immunreaktion verwendet und ein weiterer Objektträger von einem beliebigen Tier für die Negativ-Kontrolle. Diese wurden vor Beginn des Versuches ca. eine halbe Stunde bei Raumtemperatur aufgetaut, dann das Gewebe mit einem Fettstift markiert und eine Histoblocklösung (10% Pferdeserum, 0,5% TWEEN 20, 0,1% BSA, in PBS) auf alle Schnitte der Objektträger aufgetragen. Nach einer Stunde wurde diese abgesaugt und es folgte eine Inkubation mit dem Primärantikörper für 16 Stunden. Da es sich um eine Doppelimmunreaktion handelte, bei der gleichzeitig zwei verschiedene Nervenfasertypen dargestellt wurden, wurden auch gleichzeitig zwei verschiedene Primärantikörper eingesetzt. Zum einen der Antikörper rabbit-alpha-PGP („protein gene product“, rb-alpha-PGP) 9.5, der alle Nervenfasertypen markiert und zum anderen der Antikörper sheep-anti-Tyrosinhydroxylase (sh-TH), der nur noradrenerge Nervenfasern markiert. Der rb- α -PGP wurde 1:10.000 verdünnt und der sh-TH 1:200. Durch die Sekundärantikörper, an die die Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt waren, konnten die sympathischen Nervenfasern dadurch zusätzlich noch in einer anderen Farbe dargestellt werden und so zwischen sympathischen und parasympathischen bzw. sensorischen Fasern unterschieden werden. Die Schnitte für die Negativ-Kontrolle wurden statt mit den Primärantikörpern nur mit PBS inkubiert.

Da die Farbreaktion des Farbstoffes Fluorescein-Iso-Thio-Cyanat (FITC), der an den Sekundärantikörper, der gegen rb- α -PGP gerichtet war, bei einem vorherigen Testverfahren nur schwach ausgefallen war, wurde ein zusätzlicher Schritt durchgeführt, der das Leuchtsignal verstärkte. Statt wie üblich im zweiten Schritt den fluoreszenzmarkierten Sekundär-Antikörper auf das Gewebe zu geben, wurde zunächst mit dem biotinmarkierten Sekundärantikörper donkey-anti-rabbit Ig Biotin inkubiert (eine Stunde und anschließend Waschen in PBS) und im darauffolgenden Schritt Streptavidin FITC auf das Gewebe gegeben, welches das Biotin bindet und so die parasymphathischen und sensorischen Nervenfasern unter Fluoreszenzlicht grün darstellt. Gleichzeitig wurde der Sekundärantikörper donkey- α -sheep Ig Cy3 auf das Gewebe gegeben (Inkubation eine Stunde), der durch den gebundenen Farbstoff Carbocyanin (Cy3) die sympathischen Nervenfasern rot leuchten lässt.

Die Schnitte wurden jeweils nach der Inkubation zweimal für jeweils zehn Minuten in PBS gestellt. Wichtig ist, dass ab dem letzten Schritt alles im Dunkeln durchgeführt wurde, da der Fluoreszenzfarbstoff seine Farbintensität verliert, wenn er zu lange dem Licht ausgesetzt ist.

Nach dem letzten Waschen wurden die Schnitte zur Fixation für zehn Minuten in 4% PFA gestellt und dann wie zuvor zweimal in PBS gewaschen (je zehn Minuten). Zum Schluss folgte das Eindecken der Schnitte mit carbonatgepuffertem Glycerol, welches das Gewebe transparent macht und aufgrund seines alkalischen pH-Wertes (8,6) verhindert, dass die Fluoreszenzfarbstoffe ausbleichen. Die fertigen Schnitte wurden im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Die Auswertung erfolgte am darauffolgenden Tag, da die Farbstoffe einige Zeit benötigten, um ganz in das Gewebe einzudringen und die optimale Farbintensität zu entwickeln.

2.3.2 Übersicht über die bestimmten Parameter

Die Tabellen 2.4 – 2.8 zeigen, welche Parameter im Einzelnen erhoben wurden. Dabei beziehen sich alle Parameter auf den linken Ventrikel, sofern nichts anderes erwähnt wird. Die Abkürzungen werden am Ende der Tabelle 2.8 erläutert.

Tab. 2.4: Übersicht über die bestimmten Parameter bezüglich Körper- und Herzdimensionen

Abkürzung	Parameter
KG [g]	Körpergewicht der Maus
G(IV) [mg]	Gewicht des Ventrikels
G(IV)/KG [%]	Verhältnis von linkem Ventrikel- zu Körpergewicht
V(IV) [mm ³]	Volumen des linken Ventrikels

Tab. 2.5: Übersicht über die bestimmten Parameter bezüglich der Myokardzusammensetzung

Abkürzung	Parameter
V _v (Myo/IV) [%]	Volumendichte der Myozyten
V _v (Int/IV) [%]	Volumenanteil des Interstitiums
V(Myo,IV) [mm ³]	Absolutes Volumen der Myozyten
V(Int,IV) [mm ³]	Absolutes Volumen des Interstitiums
S(Myo)* [mm ²]	Oberfläche des Sarkolemm
V(Myo)/S(Myo)* [m]	Volumen-Oberflächen-Verhältnis der Myozyten
L/S* [1/m]	Gewebeschrumpfung aufgrund der Paraffineinbettung

* dieser Parameter wurde nur bei den Tieren mit Adipositas und der zugehörigen Kontrollgruppe bestimmt

Tab. 2.6: Übersicht über die bestimmten Parameter bezüglich der Kardiomyozyten

Abkürzung	Parameter
V _v (Mi/IV) [%]	Volumenanteil der Mitochondrien
V _v (Mf/IV) [%]	Volumenanteil der Myofibrillen
V _v (Sp/IV) [%]	Volumenanteil des Sarkoplasmas
V _v (Nuc/IV) [%]	Volumenanteil der Zellkerne
V _v *(Lip/IV) [%]	Volumenanteil der Lipidtropfen
V(Mi,Myo) [mm ³]	Absolutes Volumen der Mitochondrien

V(Mf,IV) [mm ³]	Absolutes Volumen der Myofibrillen
V(Sp,IV) [mm ³]	Absolutes Volumen des Sarkoplasmas
V(Nuc,IV) [mm ³]	Absolutes Volumen der Zellkerne
V*(Lip,IV) [mm ³]	Absolutes Volumen der Lipidtropfen

* dieser Parameter wurde nur bei den Tieren mit Adipositas und der zugehörigen Kontrollgruppe bestimmt

Tab. 2.7: Übersicht über die bestimmten Parameter bezüglich der Kapillaren

Abkürzung	Parameter
L _v (kap/IV) [1/μm ²]	Längendichte der Kapillaren
L(kap,IV) [m]	Absolute Länge der Kapillaren

Tab. 2.8: Übersicht über die bestimmten Parameter bezüglich der Innervation

Abkürzung	Parameter
L _v (nf,IV) [1/μm ²]	Längendichte der Nervenfasern
Q _Q (ax/nf)	Anzahl der Axone pro Nervenfasern
L(ax,IV) [m]	Absolute Länge der Axone
nf(sym,Vf) [%]	Anteil der sympathischen Nervenfasern an den gesamten Nervenfasern der Vorhöfe
d(GS _{parf}) [%]	Grad der Gewebeschrumpfung durch Paraffineinbettung

KG = Körpergewicht, G = Gewicht, IV = linker Ventrikel, V_v = Volumendichte, V = absolutes Volumen, Myo = Kardiomyozyten, Int = Interstitium, Mit = Mitochondrien, Mf = Myofibrillen, Sp = Sarkoplasma, Nuc = Nucleus, Lip = Lipidtropfen, nf = Nervenfasern, kap = Kapillaren, L_v = Längendichte, Q_Q(ax/nf) = Anzahl der Axone pro Nervenfasern, d = Grad GS_{parf} = Gewebeschrumpfung durch Paraffineinbettung, sym = sympathisch, Vf = Vorhöfe (rechter und linker);

2.3.3 Berechnung der Parameter im Einzelnen

2.3.3.1 Körper- und Herzdimensionen

Das Körpergewicht und das Gewicht des linken Ventrikels ($G(IV)$) wurden durch exaktes Wiegen ermittelt. Das Volumen des linken Ventrikels ($V(IV)$) wird berechnet, indem man das Gewicht durch die Dichte ρ von Muskulatur dividiert ($\rho_{\text{musk}}=1,06 \text{ g/cm}^3$):

$$V(IV) = G(IV)/\rho_{\text{musk}} \quad [\text{mm}^3] \quad (\text{Mendez und Keys 1961})$$

2.3.3.2 Myokardzusammensetzung

Um die Volumendichte und das absolute Volumen der Myozyten und des Interstitiums zu bestimmen, wurden die Semidünnschnitte lichtmikroskopisch bei 40facher Vergrößerung ausgewertet. Es wurde ein Lichtmikroskop Oylmpus BX51 (Olympus, Hamburg, BRD) verwendet, das mit einer Digitalkamera (Oylmpus DP72) ausgerüstet war. Mit Hilfe der NewCast stereology software (Visiopharm, DK) wurde das Schnittpräparat in Sichtfelder eingeteilt, auf die dann ein 25-Punkte-Raster projiziert wurde. Diese Einteilung wurde gemäß dem „systematic uniform random samplings“ (Mayhew TM 1991) an einer zufällig ausgesuchten Stelle begonnen und dann in regelmäßigen Abständen fortgesetzt. Mit Hilfe des Punkterasters wurden die Punkte gezählt, die auf Myozyten ($P(\text{Myo})$), bzw. auf das Interstitium ($P(\text{Int})$) fielen. Die Summe von $P(\text{Myo})$ und $P(\text{Int})$ ist die Gesamtzahl aller gezählten Punkte (P_{ges}). Es wurden pro Tier zwei Schnittpräparate ausgewertet, was einer Anzahl von ca. 25-35 Zählfeldern mit jeweils 25 Punkten pro Tier entspricht. Der Volumenanteil wurde wie folgt berechnet (am Beispiel der Myozyten):

$$Vv(\text{Myo}/IV) = P(\text{Myo})/ P_{\text{ges}} \quad [*100\%]$$

Das absolute Volumen ergibt sich durch Multiplikation mit dem Volumen des linken Ventrikels:

$$V(\text{Myo,IV}) = [P(\text{Myo})/ P_{\text{ges}}] * V(\text{IV}) \quad [\text{mm}^3]$$

(Mühlfeld C et al. 2009)

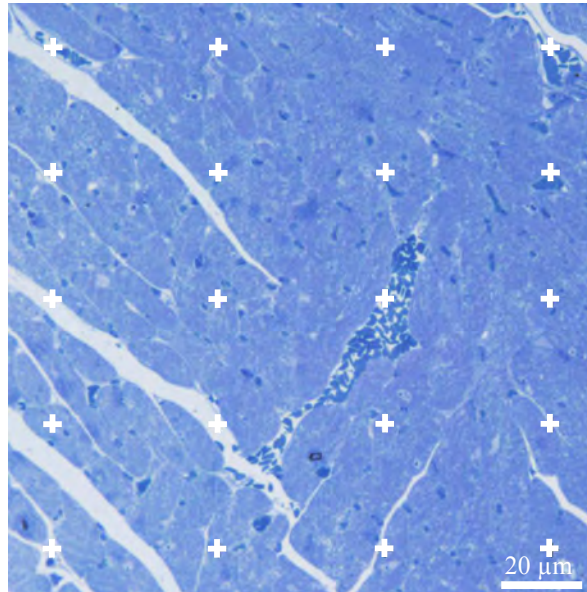


Abb. 2.2: Bestimmung der Volumendichte der Myozyten und des Interstitiums anhand eines Punkte-Rasters. Von insgesamt 16 Punkten (P_{ges}) fallen zehn Punkte auf Myozyten, $P(\text{Myo}) = 10$, und sechs Punkte auf das Interstitium, $P(\text{Int}) = 6$. Hieraus berechnet man die Volumendichte der Myozyten nach der oben beschriebenen Formel: $V_v(\text{Myo/IV}) = P(\text{Myo})/ P_{\text{ges}}$, $V_v(\text{Myo/IV}) = 10/16 = 0,625 = 62,5\%$.

Für die Bestimmung der Oberflächendichte und des absoluten Volumens der Myozyten wurden mit Hilfe eines Transmissionselektronenmikroskops LEO 902 (Zeiss, Oberkochen, BRD) entsprechende Aufnahmen angefertigt. Genau wie bei der Auswertung des Volumens von Myozyten und Interstitium wurde auch hier nach dem Prinzip des „systematic uniform random sampling“ (Mayhew 1991) vorgegangen. Bei 7000facher Vergrößerung wurde zufällig eine Stelle ausgewählt, an der das Sampling beginnen sollte. Von dieser Stelle aus wurde das Schnittpräparat systematisch abgefahren

und immer nach bestimmten Abständen eine Bildaufnahme gemacht. Pro Tier wurden zwei Ultradünnschnitte ausgewertet, so dass für jedes Tier zwischen 80 und 140 Bildaufnahmen zur Auswertung zur Verfügung standen. Zur Auswertung mit der Software Adobe® Photoshop® CS3 (Adobe Systems GmbH, Köln BRD) wurde ein Punkteraster mit sechs Linien auf die Fotos projiziert. Bei der zu bestimmenden Oberfläche handelt es sich um eine zweidimensionale Größe, die mit Hilfe eines eindimensionalen Rasters ausgewertet wird. Dadurch ist das bereits eingangs erläuterte stereologische Prinzip, nämlich dass die Summe dieser beiden Dimensionen mindestens drei ergeben muss, erfüllt (Ochs 2006). Zusätzlich zu den Schnittpunkten der Linien mit dem Sarkolemm ($I = \text{Intersections}$) wurden gleichzeitig anhand eines Punkterasters die Punkte gezählt, die auf Myozyten fielen ($P(\text{Myo})$). Zusätzlich muss die Länge der individuellen Testlinien l_T bekannt sein. In der vorliegenden Studie war $l_T = 4,8 \mu\text{m}$. Zuerst wurde die Oberflächendichte S_v berechnet. Diese ergibt sich aus der zweifachen Anzahl der Schnittpunkte mit dem Sarkolemm I , dividiert durch die Länge der Testlinie l_T , die mit der Anzahl der Punkte, die auf Myozyten fielen, multipliziert wird.

$$S_v(\text{Myo/IV}) = (2 \cdot I) / (l_T \cdot P(\text{Myo})) \quad [1/\mu\text{m}] \quad (\text{s. Abb. 2.3})$$

Durch Multiplikation mit dem Referenzvolumen $V(\text{IV})$ erhält man die absolute Oberfläche der Myozyten im linken Ventrikel:

$$S(\text{Myo,IV}) = V(\text{IV}) \cdot S_v(\text{Myo/IV})$$

(Baddeley et al. 1986, Cruz-Orive und Weibel 1990, Mühlfeld et al. 2010a)

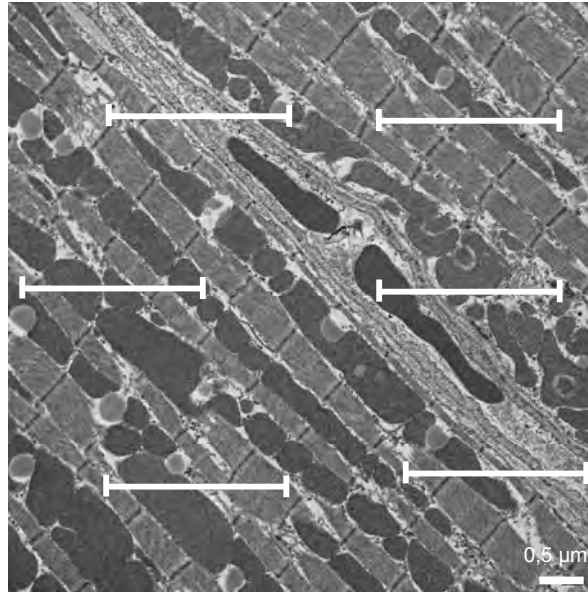


Abb. 2.3: Bestimmung der Oberflächendichte der Myozyten anhand eines Linien-Rasters.

Die Testlinien der Länge $L_t = 4,8 \mu\text{m}$ schneiden das Sarkolemm viermal, $I = 4$. Zur Bestimmung der Punkte, die auf Myozyten fallen, wurde jeweils das linke Ende der Testlinien als Punkt angesehen und gezählt, ob dieses auf Myozyten fiel oder nicht. Hier fallen fünf der linken Enden der Testlinien auf Myozyten, $P(\text{Myo}) = 5$. Die Oberflächendichte wird daraus wie folgt berechnet: $S_v = 2 \cdot 4 / (4,8 \mu\text{m} \cdot 5) = 0,333/\mu\text{m}$.

2.3.3.3 Kardiomyozyten

Die Volumendichte und das absolute Volumen der subzellulären Bestandteile wurden anhand der elektronenmikroskopischen Aufnahmen vorgenommen, die für die Auswertung der Oberflächendichte verwendet wurden. Zur Auswertung mit der Photoshop[®]-Software wurde ein Punkteraster mit zehn Punkten auf die Fotos projiziert und für jede Aufnahme die Anzahl an Punkten ermittelt, die auf eine der zu bestimmenden Struktur der Zelle fielen (Weibel 1979). Nach diesem System wurde die Anzahl der Punkte, die auf Mitochondrien ($P(\text{Mit})$), Myofibrillen ($P(\text{Mf})$), das Sarkoplasma ($P(\text{Sp})$) und die Zellkerne ($P(\text{Nuc})$) fielen, bestimmt. Die Gesamtzahl der gezählten Punkte entsprach der Anzahl von Punkten, die insgesamt auf Myozyten ($P(\text{Myo})$) fielen.

Bei der Bestimmung der Lipidtropfen wurde ähnlich vorgegangen, allerdings wurde hierbei aufgrund der geringeren Dichte dieser Strukturen ein Raster mit 200 Punkten verwendet.

Die Volumendichte der subzellulären Bestandteile wurde wie folgt berechnet, dargestellt am Beispiel von $V_v(\text{Mit}/\text{Myo})$:

$$V_v(\text{Mit}/\text{Myo}) = \frac{P(\text{Mit})}{P(\text{Myo})} \quad [*100\%]$$

Das absolute Volumen der subzellulären Bestandteile errechnete sich folgendermaßen:

$$V(\text{Mit},\text{IV}) = \left[\frac{P(\text{Mit})}{P(\text{Myo})} \right] * V(\text{Myo},\text{IV})$$

(Mühlfeld et al. 2010a)

2.3.3.4 Kapillaren

Für die Bestimmung der absoluten Länge der Kapillaren im linken Ventrikel wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen nach dem gleichen Prinzip angefertigt, wie es bei den Aufnahmen für die Bestimmung der Oberflächendichte und des Volumens der subzellulären Bestandteile gemacht wurde, allerdings bei 3000facher Vergrößerung. Die Auswertung wurde wiederum mit der Photoshop-Software vorgenommen. Die Randlinien der elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden dabei als Linien eines unabhängigen Zählfeldes angesehen („unbiased counting frames“, Gundersen 1977), d. h. der linke und der untere Rand der Aufnahme wurden als „exclusion line“ (Gundersen 1977) betrachtet und die beiden anderen Ränder als „inclusion line“ (Gundersen 1977). Bei jeder Aufnahme wurden die Anschnitte von Kapillaren Q innerhalb dieses Zählfeldes gezählt. Ausgenommen davon waren Anschnitte, die die „exclusion lines“ berührten. Die Längendichte L_v für längliche Strukturen wie Kapillaren innerhalb eines Referenzvolumens ($V(\text{IV})$) ist proportional zu der Anzahl der Anschnitte (Q) der Strukturen in einem Zählfeld der Fläche A_T (Mühlfeld et al. 20010a). Somit gilt für die Berechnung der Längendichte der Kapillaren folgende Formel:

$$L_v(\text{kap/IV}) = (2 \cdot Q) / A_T \quad [1/\mu\text{m}^2]$$

Durch Multiplikation mit dem Referenzvolumen, erhält man die absolute Länge der Kapillaren im linken Ventrikel:

$$L(\text{kap,IV}) = L_v(\text{kap/IV}) \cdot V(\text{IV}) \quad [\text{m}]$$

(Mühlfeld et al. 2010a)

2.3.3.5 Innervation

Zur Quantifizierung der Nervenfasern wurden in der vorliegenden Arbeit die Paraffinschnitte verwendet. Hierfür wurden mittels der immunhistochemischen Methode die Nervenfasern angefärbt und lichtmikroskopisch die Nervenfasern ausgezählt.

Wenn man Gewebe in Paraffin einbettet, muss man immer die damit verbundene Schrumpfung des Gewebes mit einberechnen. Die Schrumpfung beträgt ca. 50%, allerdings ist sie je nach Gewebeart und Einbettung unterschiedlich stark, so dass der Grad der Schrumpfung für jede Einbettung neu bestimmt werden muss (Dorph-Petersen et al. 2001). Von jedem Tierherz wurde deshalb ein Probenblöckchen separat gewogen, das exakt ermittelte Gewicht durch die Gewebedichte von Muskulatur ($1,06/\text{mm}^3$) dividiert und so das Ausgangsvolumen (Volumen vor der Einbettung, $V_{\text{prä}}$) dieses Blöckchens berechnet. Danach wurde das Probenblöckchen separat in Paraffin eingebettet. Die Bestimmung des Volumens nach der Paraffineinbettung (V_{post}) erfolgte nach der Cavalieri Methode (Gundersen und Jensen 1987, Mayhew 1991). Das komplette Blöckchen wurde in parallele t μm dicke Schnitte (hier: $t=7\mu\text{m}$) aufgeschnitten, von denen jeder k te Schnitt (hier: $k=5$) auf einen Objektträger aufgenommen wurde. Wichtig ist dabei, dass die Position des ersten Schnittes zufällig in einem Intervall zwischen 0 und k gewählt wurde („systematic uniform random sampling“, Mayhew 1991). Um die Gewebeflächen der einzelnen Schnitte zu bestimmen, wurde unter dem Lichtmikroskop auf die Schnitte ein Punkteraster projiziert, wobei die Fläche pro Punkt genau definiert war ($a(p)$). Hierbei ist zu beachten, dass diese Projektion rein zufällig geschah und nicht nach einem zuvor festgelegten Muster („unbiased“, Mayhew 1991). Die Anzahl der

Punkte, die auf das Gewebe (G) fielen, wurden gezählt, P(G). Die Auswertung erfolgte bei 1,25facher Vergrößerung mit dem Lichtmikroskop (Olympus BX51); von jedem Tier standen so ca. 40-80 Schnitte zur Verfügung. Das Volumen nach der Einbettung wurde wie folgt errechnet:

$$V_{\text{post}} = k * t * a(p) * \sum P(G).$$

Der Grad der Gewebeschrumpfung d(GS) konnte nun wie folgt bestimmt werden:

$$d(\text{GS}_{\text{paraf}}) = (V_{\text{prä}} - V_{\text{post}}) / V_{\text{prä}} \quad [\%]$$

Der Korrekturfaktor für die Gewebeschrumpfung bei Längenbestimmungen ist somit

$$[1 - d(\text{GS}_{\text{paraf}})]^{(2/3)}.$$

(Mühlfeld et al. 2010b)

Um die Gesamtlänge aller Axone des linken Ventrikels $L(\text{ax,IV})$ zu ermitteln, waren mehrere Schritte notwendig. Zuerst wurde die Längendichte der Nervenfasern $L_v(\text{nf/IV})$ bezogen auf das Referenzvolumen $V(\text{IV})$ bestimmt. Es wurden mit Hilfe der NewCast stereology software die einzelnen Schnittpräparate zufällig in gleichgroße Sichtfelder eingeteilt und auf diese jeweils ein Testsystem bestehend aus 4 Zählfeldern, „unbiased counting frames“ (CF) projiziert (Gundersen 1977). Die Fläche der Zählfelder ($a(\text{CF})$) war ebenfalls bekannt. Bei der Auswertung wurden, entsprechend der Bestimmung der Kapillarlänge, alle Queranschnitte von Nervenfasern ($P(\text{nf})$) innerhalb eines Zählfeldes gezählt. Ausgenommen davon waren wiederum die Anschnitte, die die untere oder linke Randlinie, die „exclusion line“ (Gundersen 1977), berührten. Durch Fokussieren wurde der obere und der untere Rand des Schnittes festgestellt und der Fokus dann auf die Mitte des Schnittes eingestellt. Zusätzlich wurde gezählt, wie viele Ecken der Zählfelder auf das Gewebe fielen ($P(\text{CF})$), um die Gesamtfläche A der Probe ermitteln zu können. Diese ist das Produkt aus der Fläche des Zählfeldes $a(\text{CF})$ und $P(\text{CF})$.

Mit Hilfe der zur Längendichteberechnung üblichen Formel wurde nun die Längendichte der Nervenfasern berechnet:

$$L_v(\text{nf}/\text{IV}) = (2 * P(\text{nf}))/A \quad [1/\mu\text{m}^2] \quad (\text{s. Abb. 2.4})$$

Bezogen auf das Referenzvolumen und unter Berücksichtigung des Korrekturfaktors für die Gewebeschrumpfung bei Längenbestimmungen $[1 - d(\text{GS}_{\text{paraf}})]^{(2/3)}$ wurde die absolute Länge der Nervenfasern ermittelt:

$$L(\text{nf},\text{IV}) = L_v(\text{nf}/\text{IV}) * V(\text{IV}) * [1 - d(\text{GS}_{\text{paraf}})]^{(2/3)} \text{ [m]}$$

(Mühlfeld et al. 2010b)

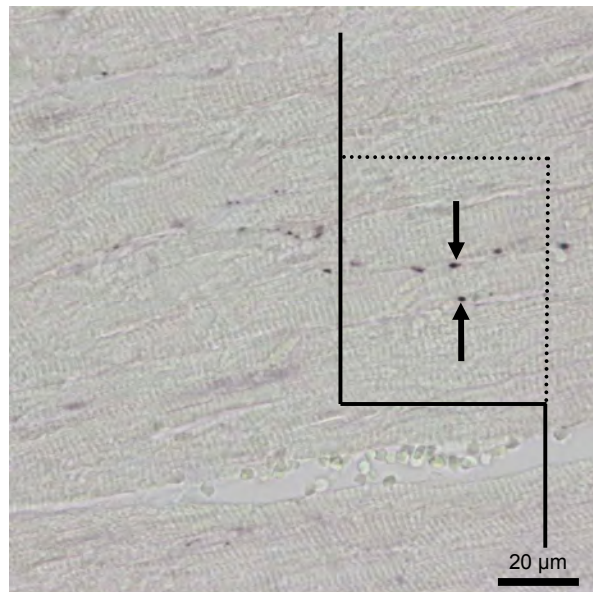


Abb. 2.4: Bestimmung der Längendichte der Nervenfasern mit Hilfe eines Zählfeldes. Die beiden Pfeile markieren die Nervenfaserschnitte, die in der Fokusebene liegen, nur diese werden gezählt. Der untere und der linke Rand des Feldes sind die „exclusion line“. Nervenfasern, die diese berühren, werden nicht mitgezählt.

Ebenfalls mit dem Transmissionselektronenmikroskop wurde die Axonendichte pro Nervenfasern $Q_Q(ax,nf)$ bestimmt. Bei 20.000facher Vergrößerung wurde das Präparat mit Hilfe der Digitalkamera systematisch abgefahren und jedes Mal, wenn ein Anschnitt einer Nervenfasern im Sichtfeld auftauchte, eine Aufnahme gemacht. Diese wurden später bezüglich der Anzahl der Axone pro Nervenfasern ausgewertet. Da nur querangeschnittene Nervenfasern gezählt werden sollten, wurde festgelegt, dass Nervenfasern, deren Durchmesser fünfmal (oder mehr) so lang waren wie der kleinste Durchmesser einer Nervenfasern, nicht mitgezählt werden sollten. Pro Tier wurden wiederum zwei Ultradünnschnitte verwendet, so dass man ca. 40-80 auswertbare Aufnahmen pro Tier erhielt.

Die absolute Länge der Axone im linken Ventrikel $L(ax,IV)$ wurde durch Multiplikation der absoluten, korrigierten Länge der Nervenfasern mit der Anzahl der Axone pro Nervenfasern $Q_Q(ax,nf)$ berechnet.

$$L(ax,IV) = L(nf,IV) * Q_Q(ax,nf) \quad [m]$$

(Mühlfeld C et al. 2010b)

Der Anteil der sympathischen Nervenfasern in Bezug auf die gesamten Nervenfasern im linken und rechten Vorhof wurde mit Hilfe der Ultracyrostatschnitte ermittelt. Diese wurden dazu unter dem Fluoreszenzmikroskop Olympus BX60 (Olympus, Hamburg, BRD), das mit einer Digitalkamera (AxioCam, MRc Zeiss, Oberkochen) ausgestattet war, betrachtet. Die Farbreaktion des PGP 9.5 Antikörpers war unter dem FITC-Farbfilter zu sehen, d.h. die gesamten Nervenfasern waren dort grün leuchtend dargestellt. Die noradrenergen Nervenfasern, die durch den sh-Th Antikörper markiert waren, leuchteten unter dem Cy3-Farbfilter rot. Die Aufnahmen, die später ausgewertet werden sollten, wurden folgendermaßen aufgenommen: Das Präparat wurde bei 20facher Vergrößerung im FITC- oder Cy3-Farbfilter abgefahren, bis ein Schnitt ins Sichtfeld kam. Unter 40facher Vergrößerung wurde dann die Qualität der Immunreaktion abgeschätzt. Beurteilt wurde dabei, ob intaktes Gewebe vorhanden war und ob darin auch angefärbte Nervenfasern zu sehen waren, bzw. ob überhaupt eine Immunreaktion stattgefunden

hatte. Es wurden nur Stellen fotografiert, an denen zumindest einige Nervenfasern zu sehen waren, aber immer so, dass exakt dieselbe Stelle zuerst im einen und dann im anderen Farbfilter aufgenommen wurden. Auf diese Weise standen für die Auswertung mindestens 10 Bilder in je zwei verschiedenen Farbfiltern pro Tier zur Verfügung. Zusätzlich wurden Aufnahmen bei einer Überlagerung der beiden Farbfilter gemacht, so dass die Nervenfasern, die von beiden Antikörpern markiert waren, gelb leuchteten, da sich die Farben entsprechend überlagerten. Allerdings konnte ein Tier der Adipositas Versuchsgruppe nicht in die Auswertung miteinfließen, da auch nach mehrmaligen Versuchen, keine Immunreaktion zu erkennen war. Die Aufnahme der gleichen Stelle im Präparat wurde einmal im Cy3- und einmal im FITC-Farbfilter geöffnet und diese nebeneinander projiziert. Nun wurden alle Nervenfasern, die sowohl PGP- als auch TH-positiv waren und alle Nervenfasern, die nur PGP- positiv waren, gezählt. Aus diesen Zahlenwerten wurde dann der Anteil der noradrenergen (TH positiven) Nervenfasern errechnet.

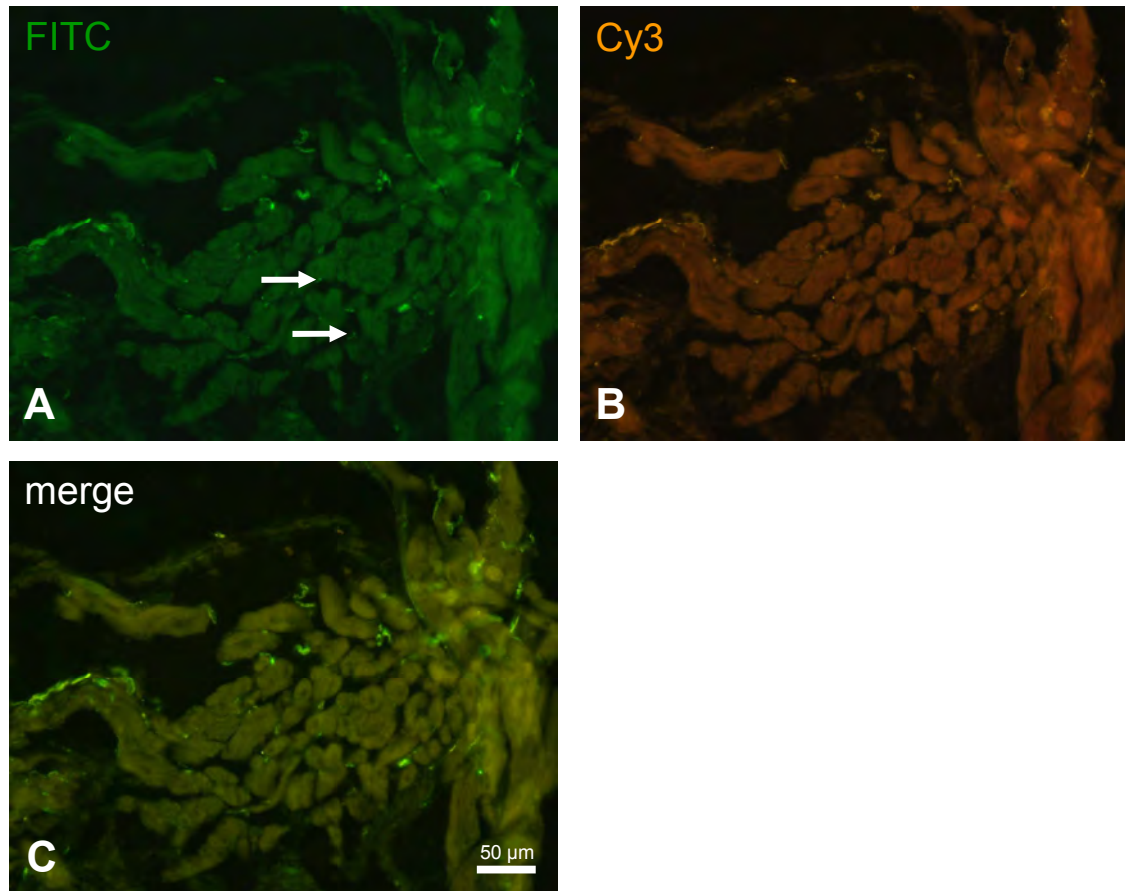


Abb. 2.5: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zur Bestimmung des Anteils der sympathischen Nervenfasern in den Vorhöfen. Der Primärantikörper α -PGP 9.5 (A) markiert alle Nervenfasern im Gegensatz zu sh-Tyrosinhydroxylase (B), welcher nur die noradrenergen Fasern darstellt. Durch Überlagerung der Farbfilter entsteht dort, wo sowohl α -PGP 9.5 als auch sh-Tyrosinhydroxylase gebunden hat, eine Überlagerung der verschiedenen Farben, so dass sich die noradrenergen Nervenfasern, welche von beiden Antikörpern markiert wurden, gelb darstellen (C). Die Pfeile (A) markieren Nervenfasern, die nur durch α -PGP 9.5 markiert waren. Durch Auszählen der PGP positiven und der sh-Tyrosinhydroxylase positiven Nervenfasern wurden die prozentualen Anteile der sympathischen Nervenfasern in den Vorhöfen bestimmt.

Tab. 2.9: Übersicht über die Messung der Parameter und die dazu verwendeten Schnitte, Färbungen und Vergrößerungen

Parameter	Messung	Schnitte	Färbung/Kontrastierung	Vergrößerung
V _V (Myo/IV), V _V (Int/IV)	Testpunkte (25 Punkte pro Sichtfeld)	Semidünnschnitte 0,75 µm	Methylenblaufärbung	40fach
V _V (Mit/Myo), V _V (Mf/Myo), V _V (Sp/Myo), V _V (Nuc/Myo)	Testpunkte (10 Punkte pro Sichtfeld)	Ultradünnschnitte 70 nm	Uranylacetate	7.000fach
V _V (Lip/IV),	Testpunkte (200 Punkte pro Sichtfeld)	Ultradünnschnitte 70 nm	Uranylacetat	7.000fach
S _V (Myo/IV)	Testlinien-segmente (6 Linien pro Sichtfeld)	Ultradünnschnitte 70 nm	Uranylacetat	20.000fach
L _V (nf/IV)	Zählfeld (Fläche: 15.730,31 µm ²)	Paraffinschnitte 7 µm	Immun-Peroxidase Reaktion mit PGP 9.5 I	40fach
Q _Q (ax/nf)	Zählfeld (Fläche : 20 µm ²)	Ultradünnschnitte 70 nm	Uranylacetat	20.000fach
L _V (kap/IV)	Zählfeld (Fläche: 1,056 µm ²)	Ultradünnschnitte 70 nm	Uranylacetat	3000fach

Volumen- gewebe- schrumpfung $d(GS_{\text{paraf}})$	Cavalieri Methode ($a(p)=2,51$ mm^2 , 100 Punkte)	Serie von Paraffin- schnitten $7 \mu\text{m}$	Richardson-Blau	1,25fach
Anteil sympathischer Nervenfasern $nf(\text{sym}, Vf)$	Auszählen der positiven Farbreaktion	Ultracryostat- schnitte $10 \mu\text{m}$	Immunfluoreszenz	40fach

V_v = Volumendichte, L_v = Längendichte, Myo = Kardiomyozyten, Int = Interstitium, IV = linker Ventrikel, Mit = Mitochondrien, Mf = Myofibrillen, Sp = Sarkoplasma, Nuc = Nucleus, Lip = Lipidtropfen, nf = Nervenfaser, kap = Kapillaren, $Q_Q(ax/nf)$ = Anzahl der Axone pro Nervenfaser, $d(GS_{\text{paraf}})$ = Gewebeschrumpfung durch Paraffineinbettung, $a(p)$ = Fläche pro Punkt, sym = sympathisch, Vf = Vorhöfe (rechter und linker);

2.4 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit dem PASW Statistics Daten-Editor Programm durchgeführt. Mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests für ungepaarte Stichproben (U-Test) wurde die asymptotische Signifikanz (p-Wert) ermittelt. Für $p < 0,05$ wurde der Unterschied als signifikant betrachtet.

3. Ergebnisse

3.1 Qualitative Beurteilung

3.1.1. Lichtmikroskopische Beurteilung

Lichtmikroskopisch ergab sich kein qualitativer Unterschied bezüglich der Myokardstruktur der Adipositas-tiere, verglichen mit den zugehörigen Kontrolltieren. Ebenso wurde im Vergleich der unterernährten Tiere mit den zugehörigen Kontrolltieren kein Unterschied bezüglich der qualitativen Struktur des Myokards festgestellt.

Die Kardiomyozyten waren in typischen Bündeln angeordnet und durch das Interstitium der Gewebespalten voneinander getrennt, wobei die Breite der Gewebespalten bei allen vier Tiergruppen vergleichbar groß war. Die einzelnen Myozyten waren durch lockeres Bindegewebe miteinander verbunden, welches aus Bindegewebsfasern und -zellen bestand und in dem kleine Blutkapillaren verliefen. Das Lumen dieser Blutkapillaren war bei allen Tiergruppen ähnlich weit. Im Interstitium der Gewebespalten befanden sich in einigen Präparaten größere Blutgefäße, beispielsweise Arteriolen, und Lymphgefäße. An einigen Stellen, an denen die Herzmuskulatur längs angeschnitten war, war die typische Querstreifung der Muskulatur zu erkennen. (Abb. 3.1)

3.1.2 Elektronenmikroskopische Beurteilung

Die einzelnen Myozyten waren durch die jeweiligen Zellmembranen und das dazwischen liegende Interstitium voneinander getrennt. Im Interstitium, in dem die Kapillaren verliefen, wurden ab etwa 12.000facher Vergrößerung auch Nervenanschnitte gefunden, wobei diese bevorzugt in der Nähe von Blutkapillaren lokalisiert waren. Im Lumen der Blutkapillaren waren meist Erythrozyten zu sehen. In den breiteren Gewebespalten befanden sich größere Blut- und Lymphgefäße und bei Präparaten, die aus einer epikardialen Schicht des Herzens stammten, wurden auch größere periphere Nerven mit über 20 Axonen pro Nervenfasern gefunden.

Die subzellulären Bestandteile der Herzmuskelzellen lagen in typischer Anordnung vor. Die Mitochondrien lagen in Anhäufungen in allen Myozyten sowohl subsarkolemmal, als auch intermyofibrillär und perinukleär. Teilweise waren die Mitochondrien leicht geschwollen, in ihrer Struktur waren sie jedoch fast immer intakt. Die leichte Schwellung ist auf die Art der Fixierung zurückzuführen, welche sich ebenfalls auf den Kontraktionszustand der Myofibrillen ausgewirkt hatte. An einigen Stellen lagen die Myofibrillen mehr oder weniger stark kontrahiert vor, sodass der I-Streifen bei diesen Myofibrillen dementsprechend schmal oder gar nicht zu sehen war, der Z-Streifen dagegen war immer vorhanden. An relaxierten Myofibrillen war aber die typische Anordnung der verschiedenen Streifen zu finden: Z-I-A-H-M-H-A-I-Z (Ferrans und Thiedemann 1983, Sommer und Jennings 1986) und auch die dünneren Aktin- und die dickeren Myosinfilamente ließen sich bei hohen Vergrößerungen gut voneinander unterscheiden. Das Sarkoplasma war im gewöhnlichen Umfang zwischen den anderen Zellorganellen und die Zellkerne meist in zentraler Lage lokalisiert. Insbesondere zwischen den Mitochondrien, aber auch an anderen Stellen innerhalb des Sarkoplasmas waren bei allen Tieren Lipidtropfen vorhanden, die allerdings gelegentlich, ebenfalls fixierungsbedingt, herausgelöst waren. Bezüglich der Größe und der Menge der Lipidtropfen wurde bei den verschiedenen Tiergruppen ein großer Unterschied festgestellt: Bei den unterernährten Tieren und den dazugehörigen Kontrolltieren waren die Lipidtropfen relativ klein und nur gelegentlich anzutreffen. Bei den Tieren der Kontrollgruppe, die zu den Adiositastieren gehören, waren deutlich mehr Lipidtropfen vorhanden, die jedoch ebenfalls eine geringere Größe besaßen. Im Gegensatz dazu waren die Lipidtropfen bei den Adipositastieren in auffallend großer Menge und deutlich höherer Zahl zu finden. Dies ist der einzige qualitative Unterschied, der in Bezug auf die Ultrastruktur der Herzmuskelzellen festgestellt wurde.

Die Struktur der Kapillaren war meist gut erhalten, also nicht kollabiert, so dass das Endothel in seinem Aufbau gut erkennbar war. Der Abstand der Kapillaren zu den benachbarten Zellen war in allen Tiergruppen vergleichbar groß.

Die Nervenanschnitte waren in sehr vielfältiger Form anzutreffen, meist waren nur wenige Axone von einer Schwannschen Zelle umgeben, es wurden jedoch auch bis zu 20

Axone pro Nervenfaser gefunden. In der Schwannschen Zelle waren Ribosomen und in den Axonen häufig Mitochondrien und dense core Vesikel zu sehen. (Abb. 3.2 und 3.3)

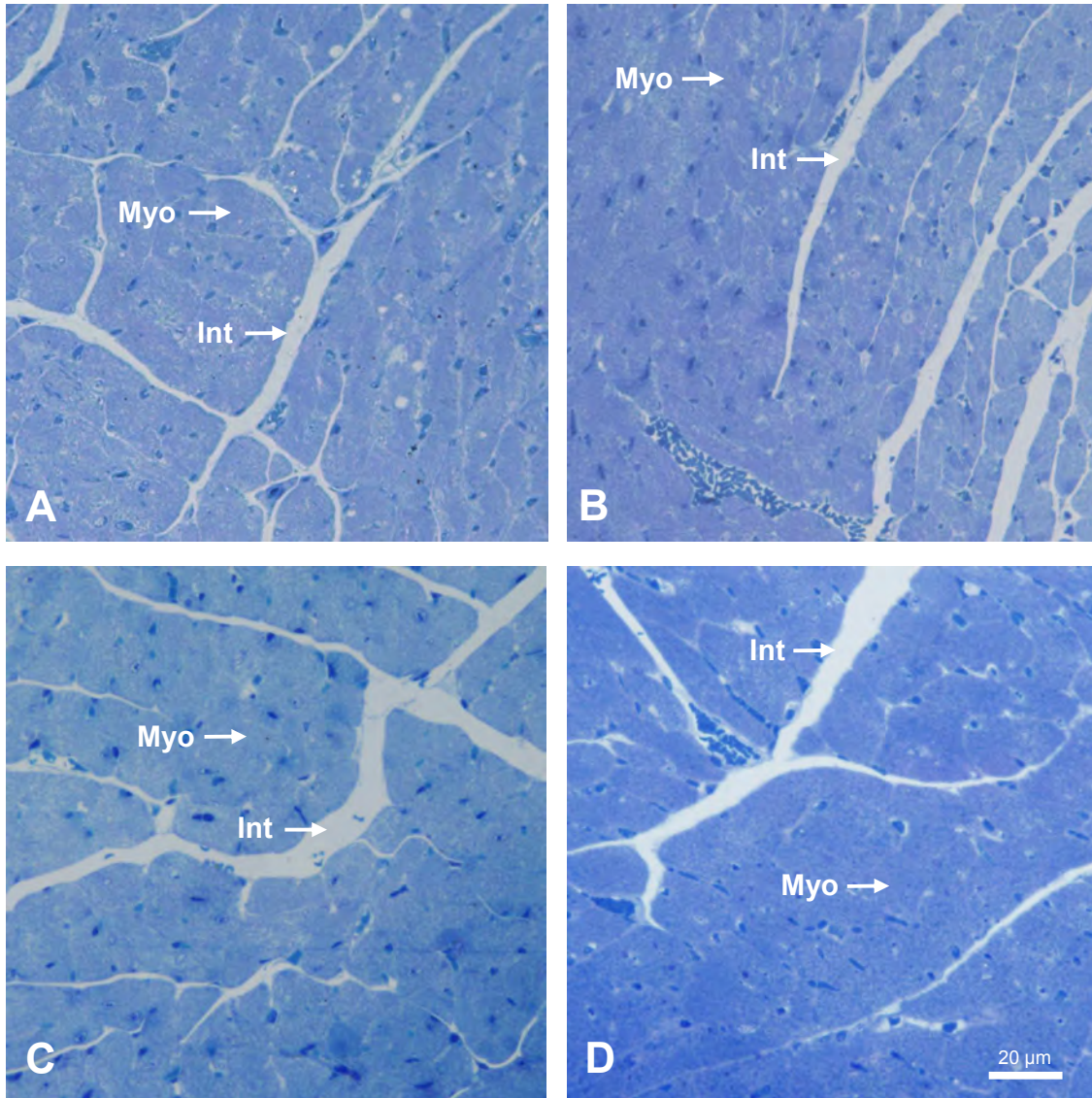


Abb. 3.1: Lichtmikroskopische Aufnahmen des Myokards. A Adipositastier. B Kontrolltier. C Tier der Unterernährungsgruppe. D Kontrolltier. Wie man auf den Abbildungen erkennen kann, gibt es keine morphologischen Unterschiede bezüglich des Myokards zwischen den jeweiligen Versuchs- und Kontrolltieren. Die Gewebespalten zwischen den Myozytenbündeln und zwischen den einzelnen Myozyten sind bei allen Tieren ungefähr gleich groß. Myo = Myozyten, Int = Interstitium.

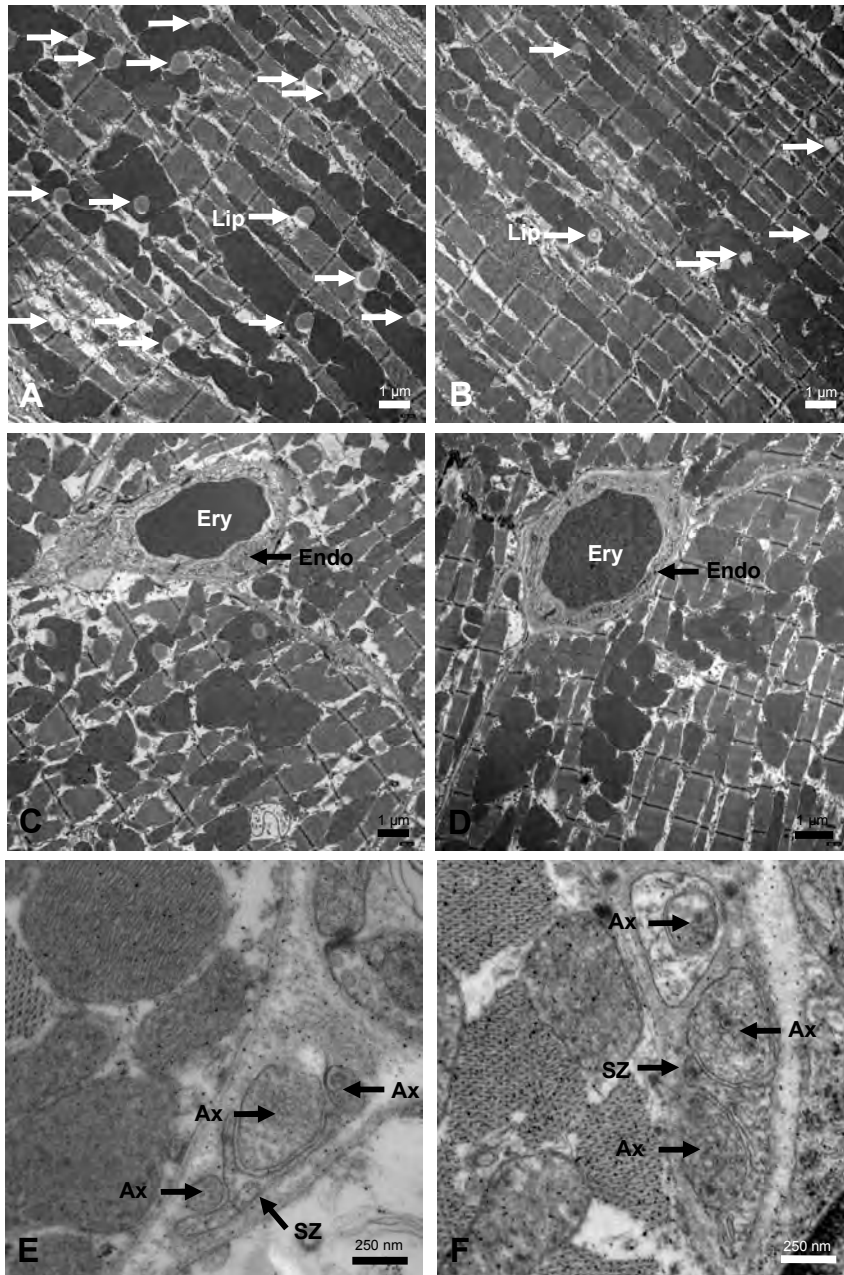


Abb. 3.2: Elektronenmikroskopische Aufnahmen, die die Morphologie der Kardiomyozyten, der Kapillaren und der Nervenfasern der Adipositas- und der Kontrolltiere im Vergleich zeigen. A, C, E: Adipositas-tiere. B, D, F: Kontrolltiere. Die Zahl und Größe der Lipidtröpfchen war bei den Adipositas-tieren deutlich erhöht im Vergleich zu den Kontrolltieren (A, B). Bezüglich der Größe und Struktur der Kapillaren war kein Unterschied zu sehen (C, D). Auch die Struktur der Nervenfasern und ihrer Axone, sowie die Anzahl der Axone pro Nervenfasern waren nicht verändert (E, F). Lip = Lipidtröpfchen, Kap = Kapillaren, Ery = Erythrozyten, Endo = Endothel, Ax = Axon, SZ = Fortsatz der Schwannschen Zelle.

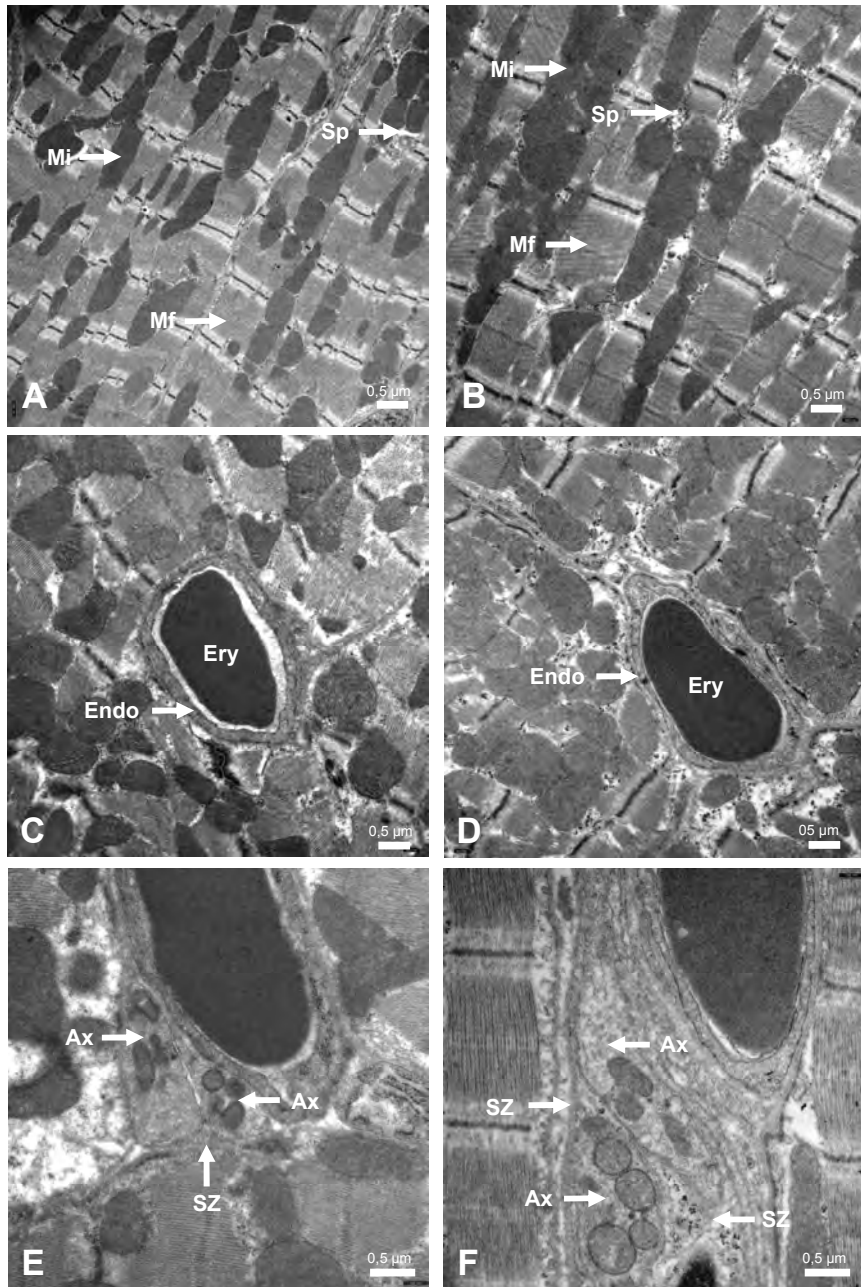


Abb. 3.3: Elektronenmikroskopische Aufnahmen, die die Morphologie der Kardiomyozyten, der Kapillaren und der Nervenfasern der unterernährten Tiere und der Kontrolltiere im Vergleich zeigen. A, C, E: unterernährte Tiere. B, D, F: Kontrolltiere. Die Struktur der Myozyten und der subzellulären Bestandteile wies keinen Unterschied zwischen den beiden Tiergruppen auf (A, B). Bezüglich der Größe und Struktur der Kapillaren war kein Unterschied zu sehen (C, D). Auch die Struktur der Nervenfasern und ihrer Axone, sowie die Anzahl der Axone pro Nervenfasern waren nicht verändert (E, F). Mit = Mitochondrien, Sp = Sarkoplasma, Mf = Myofibrillen, Kap = Kapillaren, Ery = Erythrozyten, Endo = Endothel, Ax = Axon, SZ = Fortsatz der Schwannschen Zelle.

3.2. Quantitative Ergebnisse

Die ermittelten Daten der Adipositas-tiere und der unterernährten Tiere werden jeweils getrennt voneinander mit den Daten der zugehörigen Kontrollgruppe verglichen.

Bei allen angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte von je einer Tierversuchsgruppe bzw. Kontrollgruppe plus/minus (\pm) mittlere Standardabweichung.

3.2.1 Tierversuchsgruppe Adipositas

3.2.1.1 Körper- und Herzdimensionen

Das Körpergewicht der Tiere der Adipositasgruppe war im Vergleich zu dem der Kontrolltiere um das 1,62fache höher ($p=0,009$). Das Gewicht des linken Ventrikels war um das 1,17fache höher ($p=0,009$). Anhand dieser Werte kann man erkennen, dass die Gewichtszunahme in Bezug auf Körper und linken Ventrikel nicht proportional stattgefunden hat. Diese interessante Feststellung wurde durch den Vergleich des Verhältnisses des Gewichts von linkem Ventrikel und Körpergewicht bestätigt. Dieses war bei den Adipositas-tieren signifikant kleiner als bei den Kontrolltieren ($p=0,009$).

Wie man aufgrund des höheren Gewichtes erwartet hatte, war auch das Volumen des linken Ventrikels bei der Adipositasgruppe signifikant höher als bei der Kontrollgruppe ($p=0,009$).

3.2.1.2 Myokardzusammensetzung

Die Volumendichte von Myozyten und Interstitium im linken Ventrikel war im Rahmen der Hypertrophie nicht signifikant verändert. Das absolute Volumen der Myozyten war jedoch um das 1,18fache erhöht ($p=0,009$). Das absolute Volumen des Interstitiums bei der Adipositasgruppe hat um das 1,1fache zugenommen, die Zunahme war jedoch nicht signifikant ($p=0,465$).

Die Gesamtoberfläche der Kardiomyozyten der Tiere der Adipositasgruppe war signifikant größer geworden ($p=0,009$). Der Mittelwert ist um das 1,29fache größer im Vergleich zur Kontrollgruppe (KG: $18,46 \text{ mm}^2 \pm 2,00$, AG: $23,90 \text{ mm}^2 \pm 3,70$). Das

Verhältnis von Volumen und Oberfläche hat sich dagegen nicht signifikant verändert ($p=0,249$), da beide Parameter gleichermaßen zugenommen haben.

3.2.1.3 Kardiomyozyten

Die Volumendichten der intrazellulären Substanzen der Kardiomyozyten blieben relativ konstant. Dafür gab es einen signifikanten Unterschied zwischen der Adipositasgruppe und der Kontrollgruppe bezüglich des absoluten Volumens der Mitochondrien ($p=0,028$). Dieses war bei der Adipositasgruppe um das 1,15fache höher als bei den Kontrolltieren. Das absolute Volumen von Myofibrillen und Zellkernen war nicht signifikant verändert. Der Mittelwert des absoluten Volumens des Sarkoplasmas war um das 1,24fache höher im Vergleich zur Kontrollgruppe. Trotzdem war die Zunahme nicht signifikant ($p=0,117$), was vermutlich auf einen überdurchschnittlich hohen Wert eines der Kontrolltiere zurückzuführen ist (Mittelwert der Kontrollgruppe: $12,11 \text{ mm}^3 \pm 5,97$, Wert des einzelnen Kontrolltieres: $22,59 \text{ mm}^3$).

Die Volumendichte der Lipidtropfen im linken Ventrikel der Adipositastiere betrug $1,24\% \pm 0,65$, der der Kontrollgruppe nur $0,14\% \pm 0,07$ ($p=0,009$). Dementsprechend war das absolute Volumen der Lipidtropfen bei der Adipositasgruppe etwa um das 10fache höher ($p=0,009$).

3.2.1.4 Kapillaren

Die Kapillaren in der Adipositasgruppe waren mehr als 100 Meter, also 1,3fach, länger als die der Kontrollgruppe, so dass es sich hier um eine signifikante Zunahme der absoluten Länge der Kapillaren handelt ($p=0,028$). Das Verhältnis der Länge der Kapillaren zum Körpergewicht betrug bei den Adipositastieren nur noch 80,5% des Wertes der Kontrolltiere, der Unterschied war statistisch aber nicht signifikant.

3.2.1.5 Innervation

Die Gewebeschrumpfung aufgrund der Paraffineinbettung ergab keinen signifikanten Unterschied im Vergleich der beiden Gruppen (KG: $64,37\% \pm 9,38$, AG: $61,54\% \pm 8,21$, $p=0,602$).

Die Längendichte der Nervenfasern war annähernd gleich geblieben, wohingegen die absolute Länge der Axone nach Einberechnen der Gewebeschrumpfung bei den Tieren der Kontrollgruppe um das 1,34fache zugenommen hatte. Sie betrug $16,30 \text{ m} \pm 5,20$ bei den Kontrolltieren und $21,77 \text{ m} \pm 7,93$ bei den Adipositastieren, was statistisch gesehen aber nicht signifikant war ($p=0,251$).

Hinsichtlich der Anzahl der Axone pro Nervenfasern unterscheiden sich die beiden Versuchsgruppen ebenfalls nicht ($p=0,917$). In Abb 3.4h ist die relative Häufigkeit einer bestimmten Anzahl von Axonen pro Nervenfasern im Vergleich von Kontroll- und Adipositasgruppe dargestellt.

Der Vergleich der Anteile der verschiedenen Nervenfasern in den Vorhöfen ergab keinen signifikanten Unterschied. Der Anteil der sympathischen Nervenfasern an den gesamten Nervenfasern betrug 90,7% bei den adipösen Tieren und 88,0% bei den Kontrolltieren.

Die Tabellen 3.1 - 3.5 zeigen die Ergebnisse der licht- und elektronenmikroskopisch bestimmten Parameter der Adipositas- und der dazugehörigen Kontrollgruppe. Für $p < 0,05$ ist der Unterschied signifikant; die Parameter mit signifikantem Unterschied sind fett markiert. Die Abkürzungen werden am Ende der Tabelle 3.5 erläutert.

Tab. 3.1 Übersicht über die einzelnen Ergebnisse der Parameter bezüglich der Körper- und Herzdimensionen der Adipositastiere und der zugehörigen Kontrolltiere

Parameter	Kontrollgruppe	Adipositasgruppe	p-Wert
KG [g]	$31,6 \pm 1,67$	$51,2 \pm 1,92$	0,009
G(lv) [mg]	$101,76 \pm 7,88$	$118,86 \pm 6,11$	0,009
G(lv)/KG [%]	$0,323 \pm 0,033$	$0,232 \pm 0,014$	0,009
V(lv) [mm³]	$96 \pm 7,43$	$112 \pm 6,44$	0,009

Tab. 3.2: Übersicht über die einzelnen Ergebnisse der Parameter bezüglich der Myokardzusammensetzung der Adiposittiere und der zugehörigen Kontrolltiere

Parameter	Kontrollgruppe	Adipositasgruppe	p-Wert
Vv(Myo/lv) [%]	86,39 ± 1,67	87,11 ± 2,91	0,347
Vv(Int/lv) [%]	13,61 ± 1,67	12,89 ± 2,91	0,347
V(Myo,IV) [mm³]	82,96 ± 6,97	97,73 ± 7,41	0,009
V(Int,IV) [mm ³]	13,04 ± 1,71	14,40 ± 2,97	0,465
S(Myo) [mm²]	18,46 ± 2,00	23,90 ± 3,70	0,009
V(Myo)/S(Myo) [m]	4,53 ± 0,58	4,15 ± 0,58	0,249
L/S [1/m]	1,39 ± 0,58	1,21 ± 0,26	0,602

Tab. 3.3: Übersicht über die einzelnen Ergebnisse der Parameter bezüglich der Kardiomyozyten der Adiposittiere und der zugehörigen Kontrolltiere

Parameter	Kontrollgruppe	Adipositasgruppe	p-Wert
Vv(Mi/Myo) [%]	39,69 ± 2,90	38,72 ± 2,16	0,602
Vv(Mf/Myo) [%]	45,07 ± 4,27	43,72 ± 1,46	0,251
Vv(Sp/Myo) [%]	14,44 ± 6,40	15,43 ± 3,05	0,175
Vv(Nuc/Myo) [%]	1,40 ± 0,42	1,55 ± 0,74	0,917
V(Mi) [mm³]	32,88 ± 3,21	37,81 ± 2,95	0,028
V(Mf) [mm ³]	37,30 ± 3,90	42,78 ± 4,10	0,117
V(Sp) [mm ³]	12,11 ± 5,97	15,02 ± 2,68	0,117
V(Nuc) [mm ³]	1,16 ± 0,37	1,51 ± 0,69	0,465
Vv(Lip/Myo) [%]	0,14 ± 0,07	1,24 ± 0,65	0,009

V(Lip) [mm³]	0,11 ± 0,05	1,18 ± 0,53	0,009
--------------------------------	--------------------	--------------------	--------------

Tab. 3.4: Übersicht über die einzelnen Ergebnisse der Parameter bezüglich der Kapillaren der Adipositas-tiere und der zugehörigen Kontrolltiere

Parameter	Kontrollgruppe	Adipositasgruppe	p-Wert
$L_v(\text{kap}/\text{IV}) [1/\mu\text{m}^2]$	$3,5 * 10^{-3} \pm 0,4 * 10^{-3}$	$4,0 * 10^{-3} \pm 0,5 * 10^{-3}$	0,175
L(kap,IV) [m]	$340,33 \pm 51,82$	$443,27 \pm 55,61$	0,028

Tab. 3.5: Übersicht über die einzelnen Ergebnisse der Parameter bezüglich der Innervation der Adipositas-tiere und der zugehörigen Kontrolltiere

Parameter	Kontrollgruppe	Adipositasgruppe	p-Wert
$L_v(\text{nf}/\text{IV}) [1/\mu\text{m}^2]$	$0,1649 * 10^{-3}$ $\pm 6,3 * 10^{-5}$	$0,1738 * 10^{-3}$ $\pm 5,8 * 10^{-5}$	0,754
$d(\text{GS}_{\text{parf}}) [\%]$	$64,37 \pm 9,38$	$61,54 \pm 8,21$	0,602
$Q_Q(\text{ax}/\text{nf})$	$2,185 \pm 0,54$	$2,108 \pm 0,24$	0,917
$L(\text{ax},\text{IV}) [\text{m}]$	$16,30 \pm 5,20$	$21,77 \pm 7,93$	0,251
$\text{nf}(\text{sym},\text{Vf}) [\%]$	$90,66 \pm 1,45$	$87,99 \pm 5,20$	0,465

KG = Körpergewicht, G = Gewicht, IV = linker Ventrikel, V_v = Volumendichte, V = absolutes Volumen, Myo = Kardiomyozyten, Int = Interstitium, Mit = Mitochondrien, Mf = Myofibrillen, Sp = Sarkoplasma, Nuc = Nucleus, Lip = Lipidtropfen, nf = Nervenfasern, kap = Kapillaren, L_v = Längendichte, Q_Q(ax/nf) = Anzahl der Axone pro Nervenfasern, d = Grad, GS_{parf} = Gewebeschrumpfung durch Paraffineinbettung, sym = sympathisch, Vf = Vorhöfe (rechter und linker);

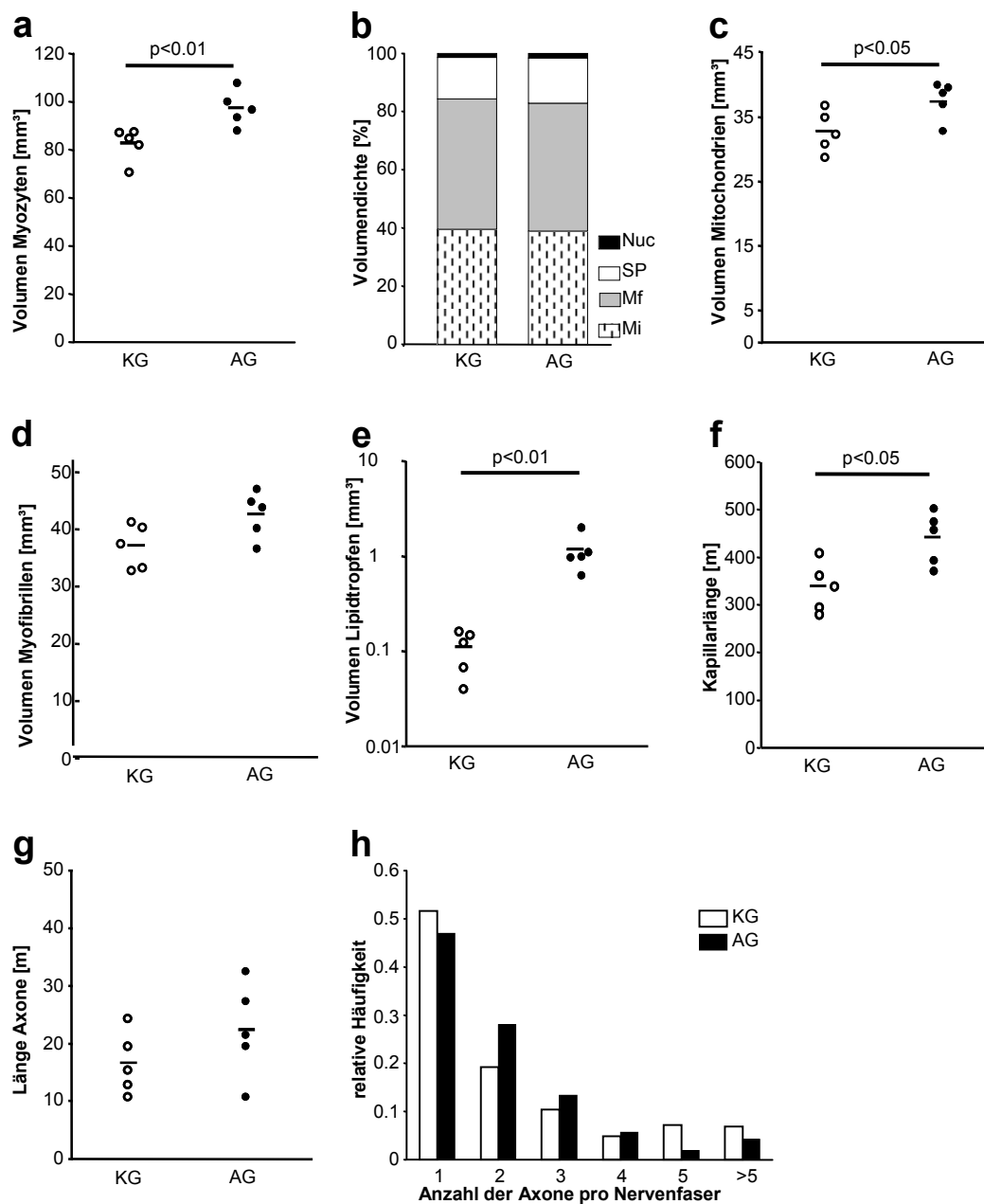


Abb. 3.4: Graphische Darstellung der wichtigsten Daten bezüglich der Adipositas-tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren. Das absolute Volumen der Myozyten war bei den Adipositas-tieren signifikant erhöht ($p=0,009$) (a). Die Volumendichten der subzellulären Bestandteile waren nahezu unverändert (b). Während das absolute Volumen der Myofibrillen nicht signifikant erhöht war (d), war das der Mitochondrien signifikant erhöht ($p=0,009$) (c), ebenso auch das absolute Volumen der Lipidtropfen ($p=0,009$) (e). Eine signifikante Zunahme wurde ebenfalls bezüglich der absoluten Länge der Kapillaren gefunden ($p=0,009$) (f), während die absolute Länge der Axone unverändert blieb (g). Pro Nervenfasern waren im Durchschnitt ca. zwei Axone zu finden. KG = Kontrollgruppe, AG = Adipositasgruppe.

3.2.2 Tierversuchsgruppe Unterernährung

3.2.2.1 Körper- und Herzdimensionen

Das Körpergewicht der unterernährten Tiere sank während der Hungerphase auf 75,8% des Ausgangsgewichtes. Dies entspricht 67,6% des Körpergewichtes der Kontrolltiere ($p=0,009$). Ebenso war das Gewicht des linken Ventrikels bei den unterernährten Tieren signifikant kleiner im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p=0,016$).

Das Verhältnis des Gewichtes des linken Ventrikels zum Körpergewicht ist, verglichen mit dem Verhältnis der Kontrolltiere, um das 1,12fache höher. Diese Zunahme ist jedoch statistisch gesehen nicht signifikant ($p=0,346$). Das Volumen des linken Ventrikels ist ebenfalls signifikant höher ($p=0,016$), wie man aufgrund der Gewichtsabnahme des Ventrikels schon hatte vermuten können.

3.2.2.2 Myokardzusammensetzung

Die Volumendichten der Myozyten und des Interstitiums waren im Vergleich der beiden Gruppen nicht signifikant verschieden (in beiden Fällen $p=0,251$). Die absoluten Volumina, sowohl der Myozyten als auch des Interstitiums, waren bei den unterernährten Tieren im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe signifikant kleiner (in beiden Fällen $p=0,251$). Das absolute Volumen der Myozyten beträgt nur 76,2% und das des Interstitiums sogar nur 66,2% des Volumens der Kontrolltiere.

3.2.2.3 Kardiomyozyten

Beim Vergleich der beiden Versuchsgruppen miteinander war bezüglich der Volumendichte der Myofibrillen, Mitochondrien, Zellkerne und des Sarkoplasmas kein signifikanter Unterschied vorhanden. Die absoluten Volumina der Mitochondrien, der Myofibrillen und des Sarkoplasmas der unterernährten Tiere waren signifikant kleiner als die absoluten Volumina dieser Größen bei den Kontrolltieren ($V(\text{Mit}): p=0,028$, $V(\text{Mf}): p=0,047$, $V(\text{Sp}): p=0,016$). Das absolute Volumen der Zellkerne blieb nahezu unverändert.

3.2.2.4 Kapillaren

Die Längendichte der Kapillaren ist bei beiden Versuchsgruppen fast identisch ($p=0,602$). Die absolute Länge der Kapillaren der unterernährten Tiere ist dagegen mehr als 100 m kürzer im Vergleich zur Kapillarlänge der Kontrolltiere, der Unterschied ist dementsprechend signifikant (UG: $344,70 \text{ m} \pm 63,80$, KG: $450,25 \text{ m} \pm 94,48$; $p=0,047$). Das Verhältnis der Länge der Kapillaren zum Körpergewicht ist nicht signifikant verändert.

3.2.2.5 Innervation

Der Vergleich der beiden Gruppen miteinander in Bezug auf die Gewebeschrumpfung aufgrund der Paraffineinbettung ergab keinen signifikanten Unterschied (KG: $44,70\% \pm 11,55$, UG: $48,64\% \pm 5,83$, $p=0,602$), ebenso blieb die Längendichte der Nervenfasern unverändert. Die absolute Länge der Axone war nahezu identisch ($p=0,841$), sie betrug bei den Kontrolltieren $27,61 \text{ m} \pm 10,06$ und bei den unterernährten Tieren $25,55 \text{ m} \pm 6,14$.

Auch ein Vergleich der beiden Versuchsgruppen in Bezug auf die Anzahl der Axone pro Nervenfasern ergab keinen signifikanten Unterschied ($p=0,175$).

Beide Gruppen hatten im Durchschnitt ca. 2 Axone pro Nervenfasern (KG $1,95 \pm 0,30$, UG $2,27 \pm 0,27$).

Der Anteil der sympathischen Nervenfasern im Verhältnis zu den gesamten Nervenfasern betrug bei den unterernährten Tieren 91,7% und bei den Tieren der Kontrollgruppe 88,4%. Der Unterschied ist jedoch nicht signifikant ($p=0,117$). Umgekehrt bedeutet dies, dass der Anteil der parasympathischen und sensorischen Nervenfasern nur 8,3% bei den unterernährten und 11,6% bei den Kontrolltieren betrug.

Die Tabellen 3.6 – 3.10 liefern einen Überblick über die Ergebnisse der bestimmten Parameter der Unterernährungs- und dazugehörigen Kontrollgruppe.

Bei $p<0,05$ ist der Unterschied signifikant, die Parameter mit signifikantem Unterschied sind fett markiert. Die Abkürzungen sind am Ende der Tabelle 3.10 erläutert.

Tab. 3.6: Übersicht über die einzelnen Ergebnisse der Parameter bezüglich der Körper- und Herzdimensionen der unterernährten Tiere und der zugehörigen Kontrolltiere

Parameter	Kontrollgruppe	Unterernährungsgruppe	p-Wert
KG [g] nach der Hungerphase	24,88 ± 1,14	16,82 ± 1,25	0,009
G(lv) [mg]	96,64 ± 16,13	72,26 ± 8,96	0,016
G(lv)/KG [%]	3,87 ± 0,50	4,32 ± 0,69	0,346
V(lv) [mm³]	91,17 ± 15,21	68,17 ± 8,45	0,016

Tab. 3.7: Übersicht über die einzelnen Ergebnisse der Parameter bezüglich der Myokardzusammensetzung der unterernährten Tiere und der zugehörigen Kontrolltiere

Parameter	Kontrollgruppe	Unterernährungsgruppe	p-Wert
Vv(Myo/lv) [%]	85,48 ± 2,00	86,96 ± 2,98	0,251
Vv(Int/lv) [%]	14,52 ± 2,00	13,04 ± 2,98	0,251
V(Myo,lv) [mm³]	77,87 ± 12,50	59,37 ± 8,49	0,028
V(Int,lv) [mm³]	13,30 ± 3,27	8,80 ± 1,77	0,028

Tab. 3.8: Übersicht über die einzelnen Ergebnisse der Parameter bezüglich der Kardiomyozyten der unterernährten Tiere und der zugehörigen Kontrolltiere

Parameter	Kontrollgruppe	Unterernährungsgruppe	p-Wert
Vv(Mi/Myo) [%]	36,25 ± 2,32	35,70 ± 1,76	0,465
Vv(Mf/Myo) [%]	52,77 ± 3,54	54,66 ± 1,58	0,347
Vv(Sp/Myo) [%]	9,27 ± 2,30	7,80 ± 0,70	0,175
Vv(Nuc/Myo) [%]	1,70 ± 0,58	1,84 ± 0,45	0,602

V(Mi) [mm ³]	28,40 ± 6,12	21,19 ± 3,23	0,028
V(Mf) [mm ³]	40,98 ± 6,08	32,43 ± 4,45	0,047
V(Sp) [mm ³]	7,14 ± 1,63	4,64 ± 0,82	0,016
V(Nuc) [mm ³]	1,34 ± 0,56	1,11 ± 0,39	0,465

Tab. 3.9: Übersicht über die einzelnen Ergebnisse der Parameter bezüglich der Kapillaren der unterernährten Tiere und der zugehörigen Kontrolltiere

Parameter	Kontrollgruppe	Unterernährungsgruppe	p-Wert
L _v (kap/IV) [1/μm ²]	4,9 * 10 ⁻³	5,0 * 10 ⁻³	0,602
L(kap,IV) [m]	450,25 ± 94,48	344,70 ± 63,80	0,047
L(kap,IV)/KG	18,02 ± 3,10	20,68 ± 4,51	0,347

Tab. 3.10: Übersicht über die einzelnen Ergebnisse der Parameter bezüglich der Innervation der unterernährten Tiere und der zugehörigen Kontrolltiere

Parameter	Kontrollgruppe	Unterernährungsgruppe	p-Wert
L _v (nf/IV) [1/μm ²]	0,2314 * 10 ⁻³ ± 5,8 * 10 ⁻⁵	0,2606 * 10 ⁻³ ± 6,1 * 10 ⁻⁵	0,347
Q _Q (ax/nf)	1,95 ± 0,30	2,27 ± 0,27	0,175
D(GS _{paraf}) [%]	44,70 ± 11,55	48,64 ± 5,83	0,602
L(ax,IV) [m]	27,61 ± 10,06	25,55 ± 6,14	0,841
nf(sym,Vf) [%]	88,4 ± 1,52	91,72 ± 3,0	0,117

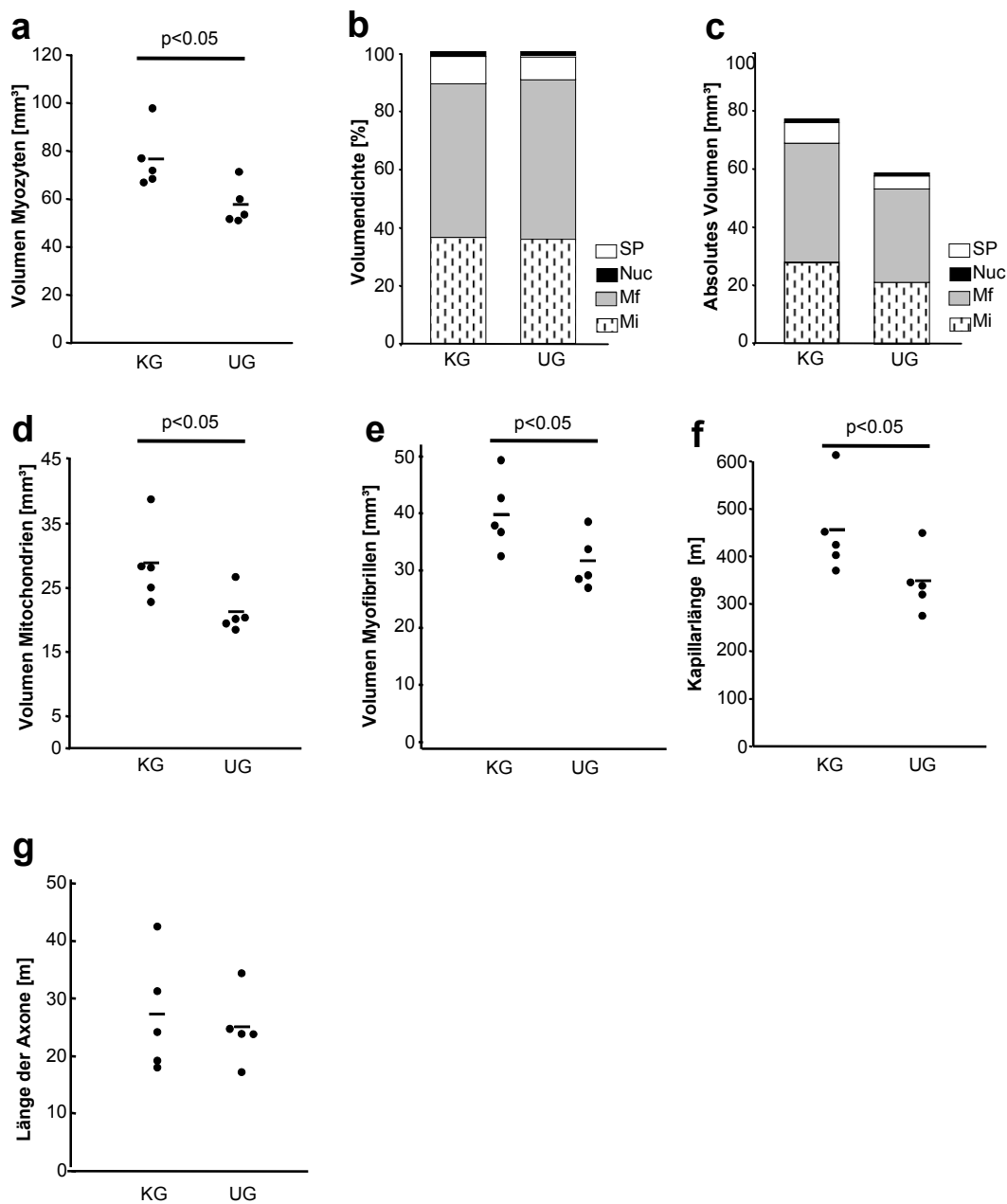


Abb. 3.5: Graphische Darstellung der wichtigsten Daten bezüglich der unterernährten Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren. Das absolute Volumen der Myozyten war bei den unterernährten Tieren signifikant reduziert (a). Die Volumendichten der subzellulären Bestandteile waren nahezu unverändert (b), während die absoluten Volumina, ausgenommen das der Zellkerne, in proportionalem Verhältnis zueinander reduziert waren (c, d, e). Eine signifikante Reduktion wurde ebenfalls bezüglich der absoluten Länge der Kapillaren gefunden ($p=0,047$) (f), während die absolute Länge der Axone unverändert geblieben war (g). KG = Kontrollgruppe, UG = Unterernährungsgruppe.

4. Diskussion

4.1. Methodenkritik

4.1.1 Tierversuch

Für beide Tierversuche wurden Mäuse vom gleichen Stamm verwendet, nämlich C57BL/6 Mäuse. Der C57BL/6 Mausstamm ist eine Inzuchtrasse, die zu den ältesten und weitverbreitetsten Rassen in der biomedizinischen Forschung gehört (Bryant et al. 2008). Für die Tierspezies Maus spricht, dass von dieser Spezies auch transgene und knockout-Mausstämme für evtl. erforderliche Vergleichs- oder Aufbaustudien vorhanden sind, was bei Ratten nicht der Fall ist.

Die Tierversuche wurden in Kooperation mit zwei unterschiedlichen Laboren durchgeführt, die jeweils andere Organe der Tiere für ihre Studien nutzten. Dies ist unter dem tierschutzrechtlichen Aspekt, ein Tier für möglichst viele Studien zu nutzen, auf jeden Fall zu befürworten. Die jeweilige Kontroll- und Versuchsgruppe stammte jeweils aus demselben Labor und da deutschlandweit gleiche Laborstandards gelten, beeinflusste diese Tatsache den Wert der Studie nicht.

Die Erzeugung von Hyper- und Atrophie des Herzens in einem Tierversuch kann auf mehrere Arten erfolgen: durch bestimmte Umweltfaktoren (Fütterung, Haltung), Genmanipulation (knock-out), spontane Mutationen, mechanische Einwirkung, z. B. Schädigung des ventromedialen Hypothalamus (Tschöp und Heiman 2001), oder als Folge bzw. Begleiterscheinung von Primärerkrankungen wie beispielsweise Diabetes mellitus, Schilddrüsenunterfunktion oder Tumorerkrankungen. In der vorliegenden Studie wurde das Tiermodell allein durch entsprechende Fütterung erzeugt. Grund dafür war, dass untersucht werden sollte, inwiefern eine rein fütterungsbedingte Hyper- und Atrophie des Herzens die Morphologie von Herzmuskelzellen, Kapillaren und Nervensystem beeinflusst und man dabei sichergehen wollte, dass die eventuellen morphologischen Veränderungen nicht auf Nebeneffekte von Genmanipulation oder anderen Erkrankungen zurückgeführt werden könnten. Beispielsweise wird zur Induktion von Adipositas bzw. Hypertrophie des Herzens sehr häufig das leptindefiziente

Mausmodell (ob/ob) mit einer Punktmutation am Leptin Gen benutzt, bei dem nachweislich eine kontraktile Dysfunktion der Herzmuskelzellen im Zusammenhang mit der Manifestation von Adipositas entsteht, was im Vergleich zu einer Tiergruppe mit ernährungsbedingter Adipositas nicht der Fall war (Dong et al. 2006). Es ist hervorzuheben, dass das in der vorliegenden Studie verwendete ernährungsbedingte Hypertrophie-Mausmodell viel realitätsnäher ist, als die genetisch bedingte Leptindefizienz.

Auch die Veränderungen des Herzens bei Atrophie, die nicht durch Nahrungsentzug, sondern durch ein Linksherzunterstützungssystem („ventricular assistant device“, LVAD) entstanden, sind schon untersucht worden (Kinoshita et al. 1988). Zudem wurden, wie bereits in der Einleitung dargelegt, morphologische Veränderungen des Nervensystems bei Hypertrophie durch Bluthochdruck und bei Atrophie im Zusammenhang mit Tumorkachexie gefunden (Kimura et al. 2006, Mühlfeld et al. 2011), so dass durch Verwendung des fütterungsbedingten Hyper- und Atrophiemodells eine ganz neue Ausgangslage geschaffen wurde. Aus diesem Grund wurde auch der intraperitoneale Glucose Toleranz Test durchgeführt, um eine Erkrankung der Tiere an Diabetes mellitus auszuschließen.

Zur Erzeugung des Übergewichtes wurde den Mäusen ein hochkalorienhaltiges Futter verabreicht, das nicht nur einen sehr hohen Fett-, sondern auch einen sehr hohen Kohlenhydratanteil enthält und somit die Nahrungszusammensetzung vieler Menschen in hoch entwickelten Ländern widerspiegelt.

Der lange Zeitraum des Tierversuchs über etwa sechs Monate wurde gewählt, um vor allem langfristige Folgen von Übergewicht evaluieren zu können. In anderen Studien wurden die Tiere häufig nur über einen Zeitraum von sieben Wochen mit kalorienreicher Nahrung gefüttert. Es wurden zwar veränderte Blutwerte und funktionelle Störungen des Herzens festgestellt, allerdings ohne signifikante Erhöhung des Körpergewichtes (Ouwens et al. 2005), während bei einem Zeitraum von 15 Wochen neben funktionellen Störungen (Lima-Leopoldo et al. 2011, Nascimento et al. 2008) auch morphologische Veränderungen auftraten (Leopoldo et al. 2010). Bei Durchführung des Tierversuches über einen Zeitraum von sechs Monaten konnte man also davon ausgehen, dass vorhandene morphologische Veränderungen nach dieser Zeit sichtbar werden würden.

Bei einem kompletten Nahrungsentzug über einen Zeitraum von 10 Tagen starben 50% der Tiere (Vandewoude und Buysens 1992a). Bei Tierversuchen im Zusammenhang mit Tumorkachexie bei Mäusen (Tian et al. 2010, Mühlfeld et al. 2011), denen Tumorzellen injiziert worden waren, wurden die Tiere am 17. bzw. 21. Tag nach Tumorimplantation getötet und es wurde ein deutlicher Gewichtsverlust und morphologische Veränderungen der Herzmuskulatur und des Nervensystems festgestellt (Mühlfeld et al. 2011). Da bei Tumorkachexie zuerst einige Zeit einkalkuliert werden muss, in der der Tumor wächst und dann erst der Abbauprozess einsetzt, ist davon auszugehen, dass bei Tieren, die durch Halbierung des Futters abmagern, ungefähr die Hälfte der Zeit ausreicht, um einen deutlichen Gewichtsverlust zu erreichen. Die Tiere der Versuchsgruppe Unterernährung wurden zunächst ad libidum mit Standardfutter gefüttert, wobei die aufgenommene Futtermenge genau ermittelt wurde. Diese Menge wurde dann halbiert, was einer Diät mit 50%iger Kalorienreduktion, wie sie von vielen übergewichtigen Menschen durchgeführt wird, entspricht. Da am Ende des Tierversuches in der vorliegenden Studie das Volumen des linken Ventrikels um 25% und das Gewicht des linken Ventrikels um 20% reduziert waren, wurde bestätigt, dass bereits eine deutliche Atrophie eingetreten war, was ein weiteres Hungern und damit weiteres Leiden der Tiere nicht gerechtfertigt hätte.

4.1.2 Probenentnahme

Die untersuchten Proben wurden alle aus dem linken Ventrikel entnommen, mit Ausnahme der Proben für die immunhistochemische Untersuchung zur Bestimmung des Anteils der sympathischen Nervenfasern, hierfür wurden Proben von den Vorhöfen verwendet.

Da die morphologischen Veränderungen in Bezug auf Hyper- und Atrophie untersucht werden sollten, war es wichtig, dass die Proben aus dem linken Ventrikel entnommen wurden, da im Zusammenhang mit manifester Adipositas durchgehend eine Hypertrophie des linken Ventrikels beschrieben wird (Lauer et al. 1991, Alpert 2001, Abel ED et al. 2008, Rider et al. 2011) und häufig wurde auch eine direkte Korrelation zwischen Adipositas und der Masse des linken Ventrikels festgestellt (Harmancy et al. 2008). Im Gegensatz dazu, wird der rechte Ventrikel in vielen Studien oft als weniger deutlich

hypertroph beschrieben (Wong et al. 2006, Abel ED et al. 2008). Um das Hyper- und Atrophiemodell gut miteinander vergleichen zu können, wurde auch bei der Versuchsgruppe Unterernährung der linke Ventrikel verwendet. Ein weiterer Grund, die Hauptaufmerksamkeit auf den linken Ventrikel zu richten, ist die Tatsache, dass fast alle Studien, die funktionelle und morphologische Veränderungen bei Hyper- und Atrophie am Herzen untersucht haben, ihr Augenmerk auf diesen setzten und somit ein Vergleich mit anderen Studien besser möglich ist.

Die Vorhöfe wurden zur Bestimmung der Anteile der sympathischen Nervenfasern am Gesamtanteil der Nervenfasern ausgewählt, da die Innervation in den Vorhöfen sehr viel dichter ist als in den Ventrikeln (Momose et al. 2001, Vaseghi und Shivkumar 2008).

4.1.3 Fixierung, Einbettung und Bearbeitung der Proben

Nach Entnahme der Herzen per Sternotomie, wurden diese unmittelbar chemisch fixiert. Die für die vorliegende Studie entnommenen Herzen wurden immersionsfixiert, d. h. in eine Fixierungslösung gegeben und dort für mindestens 24 Stunden inkubiert. Eine andere Möglichkeit wäre die Perfusionsfixierung gewesen, ebenfalls eine chemische Fixierung, bei der die Proben nicht in die Fixationslösung eingelegt werden, sondern die Lösung in die versorgenden Blutgefäße injiziert wird. Dies hat den Vorteil, dass die Fixationslösung von den Gefäßen ausgehend gleichmäßiger und schneller in das umliegende Gewebe eindringen und dieses fixieren kann, weshalb diese Fixierungsmethode als Goldstandard in der Elektronenmikroskopie gilt (Marino et al. 1983, Kasukurthi et al. 2009).

Obwohl es Studien gibt, die eine qualitativ schlechtere Strukturhaltung bei Anwendung der Immersionsfixierung festgestellt haben (Schmiedl et al. 1993), wurde diese in der vorliegenden Studie durchgeführt, da die Tiere nicht nur für diese benötigt wurden, sondern die anderen Organe jeweils für andere Untersuchungen gebraucht wurden, so dass eine Perfusionslösung aus logistischen Gründen nicht möglich gewesen wäre. Im Sinne der optimalen Ausnutzung der Tiere war dies jedoch die beste Kompromisslösung und wie bei der Auswertung festgestellt wurde und auf den Aufnahmen deutlich zu sehen ist, war die Qualität der Strukturhaltung sehr gut. Zu erwähnen ist auch die Tatsache,

dass qualitative Mängel bei der hier angewandten stereologischen Auswertung eine untergeordnete Rolle spielen. Schaper et al. (1985) haben in ihrer Studie eine tabellarische Aufstellung sämtlicher Arbeiten und ihrer Ergebnisse hinsichtlich der Volumendichte von Mitochondrien und Myofibrillen und der Art der Fixierung bzw. des Fixans gemacht. Die zum Teil stark voneinander abweichenden Ergebnisse der einzelnen Studien lassen vermuten, dass die unterschiedlichen Werte nicht in erster Linie durch die Fixierung bedingt waren, sondern vielmehr andere Faktoren wie die Art der Probenentnahme (sampling), die Anzahl der Proben und der Versuchstiere, sowie die Vorgehensweise bei der Auswertung für die große Variation verantwortlich waren, da diese in der ausgewerteten Literatur nicht einheitlich praktiziert wurden (Schaper et al. 1985). Dies passte auch zu den eigenen Ergebnissen dieser Studie (Schaper et al. 1985), in der keine unterschiedlichen Volumendichten in Bezug auf Immersions- oder Perfusionsfixierung ermittelt worden waren, sondern festgestellt wurde, dass bei richtiger Durchführung die Immersionsfixierung qualitativ gute Proben liefert (Schaper et al. 1985, Barth et al. 1992). Dies hat sich in der vorliegenden Studie bestätigt, da die hier ermittelten Werte mit den in der Literatur beschriebenen Werten übereinstimmten. Außerdem wurde bei beiden Versuchsgruppen dieselbe Fixierung verwendet, so dass für beide Gruppen die gleichen Bedingungen gewährleistet waren. Wichtig ist, dass die Immersionsfixierung nach standardisiertem Verfahren durchgeführt wurde, mit dem das zuständige Labor bereits positive Erfahrungen gemacht hatte.

Ein wahrscheinlich sogar noch bedeutenderer Faktor als die Art der Fixierung selbst, ist das verwendete Fixans (Schaper et al. 1985); eine chemische Fixierung besteht immer aus dem Fixans in einer Trägersubstanz (Mühlfeld et al. 2007). Die Wirkung und Qualität einer Fixierung ist von folgenden Faktoren abhängig: von dem eingesetzten Fixans und seinen Eigenschaften, vom pH-Wert der Fixierung und seiner Änderung während des Fixierungsvorgangs, von der Osmolarität des Fixans und dem verwendeten Puffer (Hayat 1986). Je nachdem für welche Art der Verwendung die Proben, die fixiert werden sollen, bestimmt sind, muss man eventuell einen Kompromiss eingehen, wenn es beispielsweise darum geht, nicht nur die zelluläre Ultrastruktur, sondern gleichzeitig auch die Antigenität der Proben bestmöglichst zu erhalten (Skepper 2000, Mühlfeld et al. 2007).

In der Elektronenmikroskopie wird häufig in Anlehnung an Karnovsky (1965) eine kombinierte Fixierung verwendet, die zwei fixierende Substanzen enthält, nämlich Paraformaldehyd (PFA) und Glutaraldehyd (GA) (Hayat 1981, Kiernan 2000, Mühlfeld et al. 2007). Die Wirkung beider Aldehyde, PFA und GA, beruht auf deren Reaktion mit den Aminosäuren der Proteine im Probenmaterial, so dass sich dadurch Quervernetzungen (cross-linkings) zwischen den Proteinen bilden (Hayat 1986, Cheung et al. 1985). GA übertrifft alle anderen fixierenden Substanzen bezüglich der ultrastrukturellen Erhaltung von Zellstrukturen und der Stabilisierung der Oberfläche (Hayat 1986). Die Moleküle von GA haben jeweils zwei Aldehydgruppen, mit denen sie in der Lage sind, auch über unterschiedliche Distanzen hinweg irreversible Quervernetzungen mit den Proteinen einzugehen, weshalb GA bevorzugt für die Elektronenmikroskopie verwendet wird (Eldred et al. 1983, Hayat 1986, Kiernan 2000). Dagegen wird es für immunocytochemische Untersuchungen nur bedingt empfohlen, da schon geringste Konzentrationen von GA zu einer verminderten Antigenität führen (Eldred et al. 1983, Pow et al. 1995). Manche Autoren empfehlen aber zur besseren Erhaltung der Ultrastruktur eine PFA-Fixierung mit geringem Zusatz von GA über einen kurzen Zeitraum (Eldred et al. 1983, Skepper 2000); als guter Kompromiss hat sich 4% PFA und 0,2% GA für eine Stunde und anschließend 4% PFA über Nacht bewährt (Eldred et al. 1983). Da jedoch jeder Einsatz von GA die Antigenität zumindest geringfügig vermindert und zudem die Autofluoreszenz des Materials verstärkt (Pow et al. 1995), wurde in der vorliegenden Studie die Präfixierung nur mit reinem PFA (4%) durchgeführt. Die Proben, die für die Immunfluoreszenz und die Immunperoxidase-Reaktion verwendet wurden, wurden deshalb nur in PFA fixiert, da es um eine quantitative Auswertung von Nervenfasern bzw. Axonen ging und es dabei nicht riskiert werden sollte, dass aufgrund der Verwendung von GA eventuell eine geringere Immunreaktion stattfinden würde. Außerdem verhindert GA durch die stabilen Quervernetzungen der Proteine im Probenmaterial bei späterer Paraffineinbettung das Eindringen der relativ großen Moleküle von Paraffinwachs in das Probenmaterial (Kiernan 2000), was ebenfalls gegen einen Zusatz von GA sprach. Wie auf den entsprechenden Aufnahmen zu sehen ist, war die Qualität der Schnitte gut und für die quantitative Auswertung bestens geeignet. Bei der Darstellung von peripheren Nerven am

Herzen konnte zudem kein Unterschied bezüglich der qualitativen Ultrastruktur der nervalen Strukturen nach Fixierung in reinem PFA und in Kombination mit GA festgestellt werden (Kasukurthi et al. 2009). Für die Konservierung des Probenmaterials war es, wie bereits erläutert, wichtig, dass die Fixierung möglichst schnell nach dem Tod erfolgte, so dass es auch nicht möglich gewesen wäre, zuerst das Sampling der einzelnen Proben durchzuführen und diese anschließend separat zu fixieren. Die gemeinsame Fixierung der Proben in 4% Paraformaldehyd war also ein notwendiger Kompromiss, der aufgrund der erläuterten Gründe getroffen wurde (Skepper 2000).

Lediglich die Proben, die für die elektronenmikroskopische Untersuchung bestimmt waren, wurden anschließend noch in 1,5% PFA plus 1,5% GA fixiert, um deren ultrastrukturelle Erhaltung zu verbessern. Vorteil der Kombination dieser beiden Aldehyde ist, dass sie einen gegenseitigen katalytischen Effekt aufeinander ausüben (Kirkeby und Moe 1986) und sich somit gegenseitig in ihrer Wirkung verstärken und durch ihre unterschiedlichen Eigenschaften sehr gut ergänzen: PFA dringt schneller als GA in das Probenmaterial ein, da es ein geringeres Molekulargewicht hat (Cheung et al. 1985, Kiernan 2000) und dient somit der Vorfixierung in der Tiefe, während GA langsamer eindringt, dafür aber durch die irreversible Quervernetzung der Proteine eine sehr stabile Oberfläche und Zellstruktur schafft (Hayat 1981, Kiernan 2000). Die Eindringgeschwindigkeit von GA ist am besten bei Raumtemperatur und beträgt dann 0,7 mm in 3 Stunden (2% GA), nach 24 Stunden erreicht es eine Tiefe von 1,5 mm, während eine Fixierung aus 2% GA und 2% PFA innerhalb von 24 Stunden eine Tiefe von 5,0 mm erreicht (McDowell und Trump 1976). Für die Verwendung dieser Fixierung spricht auch, dass sich der Sauerstoffverbrauch bei Kombination der beiden Aldehyde deutlich reduzieren lässt, da GA allein durch die Reaktion mit den Aminen der Proteine große Mengen an Sauerstoff verbraucht (Johnson 1987).

Ein weiterer allgemein wichtiger Faktor bei der Zusammenstellung einer Fixierung ist die Wahl des Puffers, da er den pH-Wert bestimmt, der wiederum großen Einfluss auf die maximale Bindung der Aldehyde mit den Proteinen hat (Hayat1986). Die bei der Reaktion von Aldehyden und Aminosäuren freiwerdenden Protonen führen ohne Puffer zu einem pH-Wert Abfall, was das Eindringen der Aldehyde in die Zellen des Probenmaterials erschwert und schließlich ganz zum Erliegen kommen lässt. Zusätzlich

ist der Puffer eine osmotische Trägersubstanz. Das Probenmaterial ist während der Fixierung dem osmotischen Druck der Fixierungslösung ausgesetzt, der bestimmt wird von allen osmotischen Anteilen der Lösung, die die Zellmembran nicht frei passieren können. Durch diesen osmotischen Druck kommt es zu Flüssigkeitsverschiebungen im Probenmaterial, wobei ein entstandener falscher osmotischer Druck die Qualität der Strukturhaltung negativ beeinflussen kann. Folglich setzt sich der effektive osmotische Druck aus der Gesamtmolarität des Puffers und der Hälfte der Osmolarität der Aldehyde zusammen (Hayat 1981). In der vorliegenden Studie wurde für die Präfixierung mit PFA phosphatgepufferte Salzlösung (pH 7,4, 1395 osmol/l) als Puffer, für die anschließende Fixierung mit GA und PFA Hepes-Puffer (0,15 M, pH 7,35) verwendet. Es gibt zahlreiche verschiedene Puffer, die für die Fixierung von Probenmaterial in der Elektronenmikroskopie in Frage kommen und oft basiert die Auswahl einer bestimmten Zusammensetzung der Fixierung auf Labortraditionen, statt auf wissenschaftlichen Überlegungen (Mühlfeld et al. 2007). Vielmehr sollte stets eine möglichst optimale Fixierung entsprechend dem Anliegen der Studie, dem entsprechenden Probenmaterial und den logistischen Möglichkeiten angestrebt werden, wobei oft auch Kompromisslösungen nötig sind (Mühlfeld et al. 2007).

Da zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit bereits eine bewährte Methode zur gleichzeitigen Untersuchung von muskulären und neuronalen Anteilen im Herzen vorlag (Mühlfeld et al. 2010b), wurde die Fixierung in der vorliegenden Studie entsprechend den Erfahrungen dieser Studie durchgeführt.

Die anschließend an die beiden ersten Fixierungen durchgeführte Postfixierung der Proben für die Elektronenmikroskopie mit Osmium, diente der osmotischen Inaktivierung, die Osmium durch Stabilisierung der Membranlipide bewirkt (Hayat 1981). Gleichzeitig dient der Einsatz von Osmium auch der Kontrastgebung in der Elektronenmikroskopie, was aufgrund des Schwermetallcharakters von Osmium und der damit verbundenen Streuung von Elektronen möglich ist (Hayat 1981).

Ein Teil der Proben des linken Ventrikels wurden zur Disorientierung in Agarosekügelchen und diese anschließend in Paraffin eingebettet, um die Längendichte der Nervenfasern im linken Ventrikel zu bestimmen. Paraffin ist für die Einbettung der Agarosekügelchen sehr gut geeignet und hat sich in Studien zur Quantifizierung von

Axonon im Herzen bereits mehrfach bestätigt (Mühlfeld et al. 2010b, Mühlfeld et al. 2011). Ein weiterer Vorteil ist, dass beim Schneiden der Blöckchen gleichzeitig mehrere Proben angeschnitten werden, so dass für die Auswertung auf einem Objektträger Anschnitte von verschiedenen Regionen des Herzens ausgewertet werden können. Es wäre ebenso eine Gefriereinbettung und Immunfärbung der Kryostatschnitte möglich gewesen, da laut Mühlfeld et al. (2010b) keine wesentlichen Unterschiede bezüglich der Immunreaktivität oder der Sichtbarkeit der angefärbten Nervenfasern durch den Primärantikörper rabbit- α -PGP 9.5 vorhanden sind und die Wahl der Einbettungsform letztlich von der Präferenz und Erfahrung des Untersuchers abhängt, so lange das Protokoll streng eingehalten wird. Ein Nachteil von immunfluoreszenzgefärbten Schnitten ist die begrenzte Haltbarkeit, so dass die Auswertung idealerweise am Tag nach der Immunreaktion gemacht werden sollte, was weniger Flexibilität zugelassen hätte und zudem hätte die einfache Möglichkeit der Disorientierung in Agarose nicht durchgeführt werden können.

Die Vorhöfe dagegen wurden nach der Separation von den Ventrikeln in PBS gewaschen, in Saccharose inkubiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren, um später daraus Kryostatschnitte für die Immunfluoreszenz anzufertigen. Die Inkubation in Saccharose diente dabei als Gefrierschutz des Probenmaterials beim Einfrieren. Anhand der Kryostatschnitte sollte der Anteil der sympathischen Nervenfasern in den Vorhöfen bestimmt werden, um eventuell bestehende Unterschiede bezüglich der Anteile der verschiedenen Nervenfasern zwischen den Gruppen herauszufinden. Da es für eine Markierung der unterschiedlichen Nervenfasern nötig war, gleichzeitig zwei Antikörper einzusetzen, kam die Immunfluoreszenz als einzige Methode in Frage, da man nur so eine Doppelmarkierung sichtbar machen kann. Das Hauptanliegen war, einen Überblick über eventuell bestehende qualitative Unterschiede der Zusammensetzung der Nervenfasern zu bekommen und nicht in erster Linie quantitative Daten zu liefern, so dass auf eine Disorientierung der Vorhöfe vor dem Einbetten verzichtet wurde. Es wurde darauf geachtet, bei allen Tieren möglichst Schnitte aus der Mitte der Vorhöfe anzufertigen. Aus diesem Grund und aufgrund der Größe der Vorhöfe wurde die Gefriertrocknung als Einbettungsmethode gewählt, die routinemäßig in der Immunfluoreszenz verwendet wird. Außerdem lagen dem Labor aus bisherigen

Versuchen gute Ergebnisse über die Reaktivität des zusätzlich eingesetzten Antikörpers sheep-anti-Tyrosinhydroxylase mit Gefrierschnitten vor.

4.1.4 Methode der Stereologie

Alle morphologischen Daten dieser Studie, mit Ausnahme des Anteils der sympathischen Nervenfasern in den Vorhöfen, wurden nach der Methode der Stereologie, einem Teilbereich der Morphometrie, ermittelt. Die Morphometrie dient dazu, quantitative Informationen über den strukturellen Aufbau von biologischem Gewebe zu liefern, wobei es die Stereologie wiederum ermöglicht, anhand von zweidimensionalen (2D) Schnittpräparaten, Aussagen über den 3D Charakter dieser Strukturen zu treffen (Gundersen et al. 1988). Man erhält quantitative Daten, die einen statistischen Vergleich mit anderen Werten möglich machen (Weibel et al. 2007).

Die Qualität eines Ergebnisses kann durch zwei statistische Merkmale beeinflusst werden, nämlich durch die Genauigkeit (precision) und den systematischen Fehler (bias, Mayhew 2008). Bleiben diese beiden Einflussfaktoren unberücksichtigt, so wird der Wert einer Studie deutlich vermindert (Mayhew 2008). Die Genauigkeit drückt dabei aus, wie eng man sich dem eigentlichen „wahren“ Wert, der meist nicht bekannt ist, angenähert hat und kann durch Varianz und Standardabweichung ausgedrückt werden (Mayhew 2008). Sie wird maßgeblich durch zwei Faktoren bestimmt: die natürliche Variation (signal) und die von äußeren Umständen verursachten Störungen (noise), die jedoch beide unabhängig von der Probenzahl vorhanden sind (Mayhew 2008). Allerdings kann man die Genauigkeit selbst durch Erhöhung der Probenzahl steigern, beispielsweise indem man mehr Tiere, also mehr Herzen in die Auswertung mit aufnimmt oder indem man die Anzahl der Proben pro Herz erhöht (Mayhew 2008).

Der systematische Fehler basiert meistens auf einer unzureichenden Einhaltung der Regeln der Stereologie (Mühlfeld et al. 2010a) und/oder ungenauem Arbeiten und führt schnell zur Entfernung vom „wahren“ Wert (Mayhew 2008). Im Gegensatz zur Genauigkeit kann ein systematischer Fehler nicht immer entdeckt und sein Ursprung festgestellt werden und falls er entdeckt wird, können seine Auswirkungen nicht reduziert oder korrigiert werden (Mayhew 2008). Zudem lässt er sich nicht durch Erhöhung der

Probenzahl verringern oder vermeiden, im Gegenteil, mit zunehmender Probenzahl kommt es zur immer weiteren Entfernung vom „wahren“ Wert, insbesondere wenn der systematische Fehler mit Genauigkeit assoziiert ist (Mayhew 2008).

Ein weiteres Problem stellt die Größenreduzierung dar, die vor allem bei mikroskopischen Studien auftritt, da aus einem großen Organ letztendlich nur eine sehr kleine Probe entnommen wird und sich die Frage stellt, ob die Struktur des entsprechend daraus angefertigten Gewebeschnittes und die daraus resultierenden Ergebnisse repräsentativ für das ganze Organ sind (Mühlfeld et al. 2010a). Der einzige Weg, dieses und das Problem des systematischen Fehlers zu umgehen, ist das strikte Einhalten der stereologischen Prinzipien, und zwar bei Entnahme der Proben, deren Einbettung, dem Anfertigen von mikroskopischen Aufnahmen und deren Auswertung (Mayhew 2008).

Es gibt grundsätzlich zwei Möglichkeiten des Samplings (Probenentnahme). Bei dem sog. einfachen Sampling schneidet man das Herz in n Teile, wählt dann zufällig eine Zahl zwischen 1 und n und damit eine bestimmte Probe aus (Mühlfeld C et al. 2010a). Auch die nächsten Proben werden zufällig durch Zahlen ausgewählt, die voneinander unabhängig sind („independent uniform random sampling“, IURS, Mayhew 1991). Allerdings kann es hierbei passieren, dass trotz des zufälligen Auswählens, die Proben alle aus einer Region des Herzens stammen. Aus diesem Grund ist das „systematic uniform random sampling“ (SURS, Mayhew 1991) eine effizientere Möglichkeit (Mühlfeld et al. 2010a). Von k Proben wird die erste Probe durch zufälliges Auswählen einer Zahl zwischen 1 und k gezogen und dann beginnend von dieser Probe jede weitere k te Probe. Der Anfang wird also zufällig gewählt und dann systematisch fortgefahren. Dieses Verfahren wurde bei der Zuordnung der Probenblöckchen zu den einzelnen Einbettungsformen und beim Anfertigen der licht- und elektronenmikroskopischen Aufnahmen angewandt; dort wurde an einer beliebigen Stelle im Präparat die erste Aufnahme gemacht, und dann systematisch in regelmäßigen Abständen alle Weiteren, um sicher zu gehen, dass jede Stelle im Präparat dieselbe Chance hat, in die Auswertung einzugehen.

Über den linken Ventrikel wusste man aus vorangegangenen Studien, dass die Morphometrie der Kardiomyozyten regional keinen signifikanten Unterschied aufweist (Anversa et al. 1971, Anversa et al. 1978, Schaper et al. 1985, Barth et al. 1992). Die Dichte der Nervenfasern nimmt jedoch zur Herzspitze hin ab (Momose et al. 2001,

Vaseghi und Shivkumar 2008) und ebenso die Dichte der sympathischen Innervation, die im Subepicardium hoch ist und zum Subendocardium hin abnimmt (Ieda und Fukura 2009). Aus diesem Grund wäre bei einem größeren Herzen (z. B. Mensch oder Schwein) eine Anzahl von zwei Probenblöckchen aus dem linken Ventrikel, wie es in der vorliegenden Studie praktiziert wurde, nicht ausreichend, es müssten stattdessen deutlich mehr Proben in die Auswertung eingehen.

4.1.4.1 Gewebeorientierung (tissue orientation)

Da Herzmuskulatur ein anisotropes Gewebe ist, also 3D Strukturen wie Kapillaren in einer Vorzugsrichtung im Gewebe vorliegen, können bei der Auswertung der Längendichte die Ergebnisse in Abhängigkeit vom Schnittwinkel variieren, da im Präparat entsprechend unterschiedlich viele Anschnitte der Struktur gezählt werden. Um auch hier zu gewährleisten, dass jede Orientierung mit derselben Wahrscheinlichkeit auftritt, ist es am besten, „isotropic uniform random“ (IUR) Schnitte für die Auswertung von 3D Strukturen zu verwenden (Mühlfeld et al. 2010a). Zur Herstellung solcher IUR Proben empfiehlt sich für kleine Proben der „isector“ (Mattfeld et al. 1990), für größere der „orientator“ (Nyengaard und Gundersen 1992), wie es in der vorliegenden Studie praktiziert und bereits erläutert wurde. Eine weitere Möglichkeit der Disorientierung ist noch das zufällige Absinken lassen der Proben im Einbettmedium (Stringer et al. 1982).

4.1.4.2 Testsysteme

Beim Auflegen eines Testsystems gilt, wie bei allen anderen Schritten in der Stereologie auch, dass sowohl die Anordnung der Testlinien, -punkte oder -felder als auch das Auflegen des Testsystems auf die entsprechenden mikroskopischen Aufnahmen rein zufällig erfolgen muss (Ochs 2006). Beim Schneiden des Gewebes geht eine Dimension verloren, d. h. dass beispielsweise eine 3D Struktur (z. B. Mitochondrium) als Fläche abgebildet wird oder von einem Gefäß (3D) in einem Schnittpräparat nur der Anschnitt, also eine 2D Fläche, zu sehen ist. Ebenso stellt sich eine Fläche als Linie und eine Linie als Punkt dar. Aus diesem Grund werden auf die mikroskopischen Schnittpräparate geeignete Testsysteme projiziert, wobei als Voraussetzung gilt, dass die Summe aus der Dimension des Parameters, den man auswerten möchte, und der Dimension des

verwendeten Testsystems mindestens drei ergeben muss (Ochs 2006). Das bedeutet, dass man den Parameter Volumen, welcher 3D ist, mit einem Testsystem, das aus Punkten besteht, also 0D ist, auswerten kann. Dementsprechend kann man Flächen (2D) mit Hilfe eines Linien-Testsystems (1D) und Längen (1D) mit Hilfe von Testfeldern (2D) auswerten. Um die Anzahl einer bestimmten Struktur zu bestimmen, wird ein Testvolumen verwendet (Stereo 1984). Diese Prinzipien wurden in der vorliegenden Arbeit bei der Auswahl der geeigneten Testsysteme stets berücksichtigt.

4.1.4.3 Probenzahl (sample size)

Im Zusammenhang mit der Genauigkeit und dem Wert einer Studie stellt sich die Frage nach der optimalen Probenzahl. Die Variation innerhalb einer Studie entsteht einerseits aufgrund der natürlichen Variation zwischen den einzelnen Proben und andererseits aufgrund der Variation von äußeren Umständen wie z. B. das Sampling oder die Messgenauigkeit (Mayhew 2008). Ziel ist es, dass die natürliche Variation größer ist als die Äußere, wobei die natürliche Variation vor allem von der Probenzahl auf höchster Stufe abhängt, was hier die Zahl der Tiere darstellt bzw. die der Herzen (Mayhew 2008, Cruz-Orive und Weibel 1990). Ist diese Probenzahl groß genug, dann genügt es, wie zunächst angenommen und dann theoretisch belegt wurde (Gundersen und Jensen 1987), pro Tier und pro Parameter ca. 200 Punkte (Schnittpunkte mit Testlinien usw.) auszuzählen (Cruz-Orive und Weibel 1990). Wenn noch keine ausreichenden Informationen über die Variation innerhalb eines zu untersuchenden Probenmaterials vorliegen, wie hier über die Länge der Axone im linken Ventrikel, ist eine Anzahl von fünf Tieren die beste Zahl um erstmals eine Analyse durchzuführen, wie aufgrund statistischer Analysen gezeigt wurde (Cruz-Orive und Weibel 1990). Denn wenn bei fünf Tieren eine Zu- oder Abnahme eines Wertes vorhanden ist, so ist die Signifikanz dafür $<0,05$ und somit der Unterschied signifikant, was bei vier Tieren nicht der Fall wäre (Cruz-Orive und Weibel 1990).

4.1.4.4 weitere stereologische Aspekte

Für die korrekte Interpretation der erhobenen Daten ist es von großer Bedeutung, zu wissen, auf welches Referenzvolumen sich die Daten beziehen, denn die gemessenen

Größen (z. B. Volumendichte der Mitochondrien) beziehen sich zunächst nur auf den Raum, in dem sie gemessen wurden (bei der Volumendichte der Mitochondrien sind dies die Myozyten), so dass eine Änderung der gemessenen Größe von einer Änderung dieses Referenzraumes (Myozyten) abhängig ist und man somit keine Aussage über die absolute Änderung der gemessenen Größe treffen kann (Schmiedl et al. 1990). Am Beispiel der Volumendichten der subzellulären Substanzen wird dies deutlich: nimmt die Volumendichte der Mitochondrien zu, so nehmen die Volumendichten von Myofibrillen, Sarkoplasma und Zellkernen oder zumindest einer dieser Parameter ab. Aus diesem Grund ist es unerlässlich, die gemessenen Größen auch auf das Referenzvolumen, nämlich bei dieser Studie das Volumen des linken Ventrikels, zu beziehen. Man erhält den absoluten Wert eines Parameters (z. B. das absolute Volumen der Mitochondrien) durch Multiplikation mit dem Referenzvolumen und dieser absolute Wert kann mit dem der Tiere aus der Kontrollgruppe verglichen und Unterschiede diesem gegenüber festgestellt werden.

Die Verwendung von Antikörpern, wie sie zur Bestimmung der Längendichte der Axone und zur Bestimmung des Anteils der sympathischen Nervenfaser in den Vorhöfen praktiziert wurde, ist in einer quantitativ morphologischen Studie sicherlich ein Risikofaktor, der nicht unterschätzt werden darf (Mühlfeld et al. 2010b). Daher dürfen nur Antikörper eingesetzt werden, die man zuvor auf eine zuverlässige Spezifität und Effizienz hin getestet hat, wie es im vorliegenden Fall getan worden war (Mühlfeld et al. 2010b). Außerdem wurde eine gleichzeitige Negativkontrolle zu jedem Tier angefertigt und das Protokoll genauestens eingehalten, um die Bedingungen für beide Versuchs- und Kontrollgruppen gleich zu gestalten, was allerdings Unterschiede zu anderen Studien mit anderen Protokollen nicht ausschließt (Mühlfeld et al. 2010b).

Grund für das Einstellen der Fokusebene in der Mitte der Schnitte bei der lichtmikroskopischen Auswertung der Längendichte der Axone war, dass man ein bewusstes Auswählen einer bestimmten Ebene, in der z. B. die meisten scharf gestellten Nervenfaser zu sehen waren, vermeiden wollte, da dies zu einem systematischen Fehler geführt hätte.

Ein weiterer wichtiger Aspekt der quantitativen Morphologie ist die Gewebeschrumpfung („tissue shrinkage“), die bei der Auswertung von in Paraffin eingebetteten Proben

unbedingt zu beachten ist, insbesondere wenn das Referenzvolumen vor der Einbettung ermittelt wurde (Dorph-Petersen et al. 2001), was in der vorliegenden Studie ebenfalls eingehalten wurde.

4.2. Diskussion der Ergebnisse im Vergleich mit Daten aus der Literatur

Im Wesentlichen wurden drei funktionell und strukturell unterschiedliche Kompartimente des Herzens auf eine Veränderung bei fütterungsbedingter Hyper- und Atrophie hin untersucht: Die Kardiomyozyten, die Kapillaren und die Innervation des linken Ventrikels. Hervorzuheben ist hierbei, dass es bislang keine andere Studie gibt, die bei fütterungsbedingter Hyper- oder Atrophie des Herzens die Morphologie der kardialen Innervation untersucht hat, sodass es in diesem Bereich keine direkt vergleichbaren Daten gibt.

Die signifikant veränderten Werte des Körpergewichtes und das signifikant erhöhte bzw. reduzierte Gewicht und Volumen des linken Ventrikels bestätigen das verwendete Tiermodell als gute Möglichkeit, eine fütterungsbedingte Hyper- bzw. Atrophie des Herzens zu erzeugen, ohne sekundäre Krankheiten oder pathologische Einflussfaktoren.

4.2.1 Adipositas

4.2.1.1 Entstehung einer Herzhypertrophie

Die im Tierversuch der vorliegenden Studie fütterungsbedingt erzeugte Form von Adipositas ist gekennzeichnet durch eine Hypertrophie des linken Ventrikels, wobei das totale Volumen der Kardiomyozyten und die Kapillarlänge in proportionalem Verhältnis zur Herzhypertrophie erhöht sind, wohingegen die absolute Länge der Axone nicht signifikant verändert ist.

Adipositas ist assoziiert mit einer Hypertrophie des linken Ventrikels (Messerli et al. 1987, Lauer et al. 1991, Abel ED et al. 2008). In echokardiographischen Studien bei Menschen wurde die Hypertrophie meist anhand der Kammergröße und der Dicke der freien Wand des linken Ventrikels gemessen (Lauer et al. 1991), wobei in den meisten

Fällen die Wanddicke deutlich mehr zugenommen hatte, als die Kammergröße (Abel ED et al. 2008). In der vorliegenden Studie war eine deutliche Hypertrophie des Herzens schon makroskopisch im Vergleich zu den Herzen der Kontrolltiere sichtbar.

Eine Herzhypertrophie wird außer durch vermehrte Nahrungsaufnahme oder veränderte Nahrungszusammensetzung (Leopoldo et al. 2010) auch im Zusammenhang mit anderen Faktoren hervorgerufen, z. B. durch vermehrtes Training (Mattfeldt et al. 1985), Bluthochdruck (van der Laarse et al. 1989, Liao et al. 2009), eine Mutation am Leptinrezeptorgen (Christoffersen et al. 2003, Dong et al. 2006), genetische Prädisposition (Bouchard und Tremblay 1997) oder Verabreichung von Thyroxin (Campbell et al. 1991, Mattfeldt et al. 1989). Dass nicht jede Form der Übergewichtigkeit mit einer Hypertrophie assoziiert sein muss, zeigt eine Studie an Menschen mit unkomplizierter Adipositas, also ohne assoziierte Komorbiditäten, bei denen echokardiographisch keine signifikante Hypertrophie oder sonstige geometrische Veränderungen des Herzens im Vergleich zu schlanken Probanden gefunden wurden (Lacobellis et al. 2002). Dieses Ergebnis widerspricht nicht nur dem der vorliegenden Studie, sondern auch anderen Studien an Menschen, die zu der Schlussfolgerung kamen, dass Adipositas bzw. der BMI unabhängig von anderen Einflussfaktoren mit einer Hypertrophie des linken Ventrikels assoziiert ist, (de Simone et al 1994a, Peterson et al. 2004, Wong et al. 2004, Avelar et al. 2007, Rider et al. 2011).

Lacobellis et al. (2002) erhoben ihre Daten bezüglich des linken Ventrikels ausschließlich mittels Echocardiographie, was Ashrafian et al. (2011) in einer sehr aktuellen Studie als problematisch bezeichnen, da aufgrund des vermehrten Fettgewebes am Herzen die Bildqualität nicht optimal ist und zudem lediglich ein 2D Bild entsteht. Denkbar wäre es jedoch auch, dass sich bei über zehnjähriger Adipositas die Veränderungen der Herzstruktur sozusagen wieder relativieren, da in einer anderen Studie an Menschen mit längjähriger Adipositas wider Erwarten mikroskopisch keine deutlichen morphologischen Unterschiede bezüglich der Myozyten zu finden waren (Amad et al. 1965).

Ebenso gibt es auch bei Tiermodellen unterschiedliche Befunde in Bezug auf fütterungsinduzierte Herzhypertrophie, die vermutlich vom jeweiligen Zuchtstamm und der Futterzusammensetzung abhängig sind, wobei auch eine Altersabhängigkeit beschrieben ist (West und York 1998, Abel ED et al. 2008). Bei Wistar Ratten war nach

einer siebenwöchigen Verabreichung eines Futters mit hohem Fettanteil zwar noch keine signifikante Gewichtszunahme festzustellen, dafür aber eine Hypertrophie des linken Ventrikels (Ouwens et al. 2005). Im Gegensatz dazu war in zwei voneinander unabhängigen Studien bei Sprague-Dawley Ratten nach 12 bzw. 14 Wochen eine deutliche Gewichtszunahme, aber keine Herzhypertrophie eingetreten, allerdings handelte es sich dabei um mäßig fettreiches Futter, bei dem der Anteil von Fett am Gesamtkaloriengehalt nur 32% statt 50,4%, wie in der anderen Studie, betrug (Ricci et al. 2006, Carroll et al. 2006). Bei der Verwendung von Ratten zur Erzeugung einer Adipositas bzw. einer Herzhypertrophie ist zu beachten, dass das Alter bei Versuchsbeginn bei dieser Spezies ein wichtiger Faktor ist, wobei grundsätzlich gilt, je jünger die Tiere bei Beginn des Versuches sind, desto deutlicher ist auch die Ausprägung der Adipositas (West und York 1998). In der oben erwähnten Studie waren die Tiere bei Versuchsbeginn sechs Wochen alt, was die Hypothese von West und York (1998) bestätigt, denn es wurde eine deutliche Gewichtszunahme registriert (Ricci et al. 2006). Dies zeigt jedoch wiederum, dass Adipositas nicht unbedingt mit einer Herzhypertrophie einhergehen muss, und verstärkt die Vermutung, dass die Entwicklung einer Hypertrophie stark von der Zusammensetzung des Futters abhängt.

Bei Mäusen wurden ähnliche Beobachtungen gemacht. Im Zusammenhang mit einem Futter, das sowohl einen hohen Fett- als auch Kohlenhydratanteil hatte, war eine Gewichtszunahme mit Herzhypertrophie verbunden (Fang et al. 2008), bei allein hohem Fettanteil trat auch nach 16 Wochen keine Hypertrophie ein, nur in Verbindung mit erhöhtem Blutdruck (Chess 2008). Da in fast jeder Studie die Futterzusammensetzung bezüglich ihrer einzelnen Anteile variiert, ist es schwer zu sagen, ob und bei welcher genauen Zusammensetzung eine Herzhypertrophie eintritt, es besteht aber die Vermutung, dass eine allein fettreiche Ernährung nicht immer genügt, um eine Hypertrophie des Herzens zu induzieren, während eine fett- und kohlenhydratreiche Ernährung fast immer erfolgreich zu sein scheint. Bemerkenswert ist das Ergebnis einiger Studien, die herausgefunden haben, dass ein fettreiches und zugleich kohlenhydratarmes Futter bei Ratten mit induziertem Bluthochdruck die Ausprägung einer Hypertrophie vermindert (Okere et al. 2005, Duda et al. 2008). Grund dafür ist vermutlich der mit einer kohlenhydratreichen Ernährung verbundene Anstieg des Insulin- und

Leptinplasmaspiegels, wobei bekannt ist, dass sowohl Insulin als auch Leptin das kardiale Wachstum in isolierten Zellen fördern und somit an der Entstehung einer Herzhypertrophie beteiligt sein könnten (Sharma et al. 2007). Die deutliche Hypertrophie des Herzens bei den Tieren der vorliegenden Studie bestätigt, dass eine Kombination aus hohem Fett- und Kohlehydratanteil sehr gut für ein fütterungsbedingtes Hypertrophiemodell geeignet ist.

4.2.1.2 Verhältnis von linkem Ventrikel- zu Körpergewicht

In der vorliegenden Studie ist das Verhältnis von linkem Ventrikel- zu Körpergewicht bei den Adipositastieren signifikant kleiner geworden. Allgemein wird im Zusammenhang mit Adipositas in vielen Studien von einer signifikanten Korrelation, also einem linearen Zusammenhang, zwischen dem Gewicht des linken Ventrikels (Smalcelj et al. 2000) bzw. dem Herzgewicht und dem Körpergewicht berichtet (Amad et al. 1965, Chu et al. 1969, Lauer et al. 1991, Chan und Koelmeyer 2007), was ein gleichbleibendes Verhältnis bedeuten würde, wie es in einer Studie an Ratten der Fall war, allerdings wurden diese nur über einen Zeitraum von 15 Wochen gefüttert, und das Futter hatte zwar einen hohen Kaloriengehalt, aber einen geringen Fettanteil von 11,2% (Leopoldo et al. 2010). Einige Autoren vermuten, dass das Herzgewicht zunächst in linearem Verhältnis zum Körpergewicht ansteigt, das Herz aber ab einem bestimmten Grad der Adipositas weniger an Gewicht zunimmt als der Körper, so dass das Verhältnis der beiden Größen sinkt (Smith und Willius 1933, Dong et al. 2006). In einer Studie, in der über einen Zeitraum von fast einem Jahr Ratten mit fett- und kohlenhydratreichem Futter gefüttert worden waren, wurde regelmäßig das Gewicht ermittelt, so dass man eine Kurve über die Körpergewichtszunahme erhielt (Wilson et al. 2007). Aus diesem Schaubild geht hervor, dass das Körpergewicht zunächst stark anstieg, fast linear, um sich dann immer langsamer einem maximalen Wert anzunähern (Wilson et al. 2007). Das in der vorliegenden Studie signifikant kleiner gewordene Verhältnis bei den Adipositastieren im Vergleich zu den Kontrolltieren lässt also vermuten, dass das Herz bzw. der linke Ventrikel anfänglich ähnlich schnell an Gewicht zunahm, aber bereits früher als der Körper sein maximales Gewicht erreicht hatte. Da anhand der vorliegenden Werte keine Aussage über die Dynamik des Gewichts getroffen werden kann, würde sich zur

genaueren Ermittlung die Durchführung eines Versuchs anbieten, bei dem über einen langen Zeitraum regelmäßig Herz- und Körpergewicht ermittelt werden würden. Es ist hinzuzufügen, dass in der oben beschriebenen Studie gleichzeitig auch ein fettarmes und allein fettreiches Futter auf ihre Wirkung in Bezug zum Körpergewicht getestet wurden. Der Kurvenverlauf der fettreichen Fütterung war ähnlich wie bei der fettarmen Fütterung, jedoch zu Beginn weniger steil (Wilson et al. 2007).

Das klassische, jahrelang von vielen Wissenschaftlern akzeptierte, rein hämodynamische Modell in Bezug auf Veränderungen am Herzen bei Adipositas versucht diese Veränderungen, das sogenannte „cardiac remodelling“ damit zu erklären, dass durch das mit Adipositas oft einhergehende erhöhte zirkulierende Blutvolumen und den dadurch erhöhten Blutdruck bei übergewichtigen Menschen eine kompensatorische Dilatation und als Folge dieser eine Hypertrophie des linken Ventrikels entstehen (Rider et al. 2010), wodurch letztendlich dann die systolische und diastolische Dysfunktion des linken Ventrikels hervorgerufen wird (Ashrafian et al. 2011). Allerdings bleiben bei diesem Modell die metabolischen Aspekte unberücksichtigt und in einer neueren Studie konnte gezeigt werden, dass bereits ein milder Anstieg des BMI von normalgewichtig zu übergewichtig in einer exzentrischen Hypertrophie des Herzen resultiert, ohne dass es zuvor volumenabhängig zu einer Dilatation gekommen war, welche nachweislich erst ab einem besonders schweren Stadium der Adipositas auftritt (Rider et al. 2010). Es wurde deshalb eine neue Hypothese entwickelt, die metabolische und hämodynamische Faktoren berücksichtigt und der die Vermutung zugrunde liegt, dass die frühen hypertrophen Veränderungen am Herzen durch einen erhöhten Leptin-Spiegel im Blut hervorgerufen werden (Ashrafian et al. 2011, Zeidan et al. 2008).

4.2.1.3 Myokard und Kardiomyozyten

Die Myokardzusammensetzung der Adipositastiere der vorliegenden Studie hat sich aufgrund der fütterungsinduzierten Hypertrophie hinsichtlich der Volumendichten von Interstitium und Myozyten im Vergleich zu den Kontrolltieren nicht signifikant verändert, was bedeutet, dass diese beiden Größen im gleichen Verhältnis, also proportional zueinander, zugenommen haben. Ebenso wurde bei den Adipositastieren eine signifikante Zunahme des absoluten Volumens der Myozyten gefunden, wobei die

Volumendichten der subzellulären Substanzen hinsichtlich ihres prozentualen Anteils, nicht signifikant verändert waren. Dies bedeutet, dass auch intrazellulär im Kompartiment der Myozyten ein proportionales Wachstum stattgefunden hat. Im Zusammenhang mit einer forensischen Autopsie von Menschen, die aufgrund einer unkomplizierten Adipositas eine Herzhypertrophie entwickelt hatten, war das absolute Volumen der Myozyten ebenfalls signifikant erhöht (Tracy und Sander 2011). Bei einer fütterungsbedingt über 15 Wochen entwickelten Hypertrophie bei Ratten wurde ein signifikant erhöhter interstitieller Kollagenvolumenanteil gefunden (Leopoldo et al. 2010), was vermuten lässt, dass bei diesen Tieren auch das Gesamtvolumen des Interstitiums deutlich erhöht war. In Bezug auf die Entstehung von Herzhypertrophie im Zusammenhang mit Adipositas wird in einigen Studien die Bedeutung von Leptin diskutiert, da vermutet wird, dass Leptin hierbei eine große Rolle spielt (Friedmann 2000, Dong et al. 2006, Zeidan et al. 2008, Singla et al. 2010). Bei einer in-vitro-Leptinbehandlung von Myozyten wurde eine Hypertrophie dieser Zellen hervorgerufen (Zeidan et al. 2008), was die Vermutung, dass Leptin bei ernährungsbedingter Hypertrophie eine entscheidende Rolle spielt, unterstützt, da ein erhöhter Leptinplasmaspiegel in sämtlichen Formen von Adipositas (genetisch-, hypothalamisch- oder ernährungsbedingt) bei Nagetieren und Menschen gefunden wurde (Ren 2004). Leptin wird oft nur mit Adipozyten in Verbindung gebracht, es wird aber auch im Herzen, in der Gefäßmuskulatur, dem Darmepithel und der Magenschleimhaut produziert (Zeidan et al. 2008) und hat neben seinem wichtigen metabolischen Einfluss auch eine negative Wirkung auf die Kontraktion von Herzmuskelzellen und erhöht zudem die Aktivität der sympathischen Nerven (Ren 2004, Dong et al. 2006). Die festgestellte Hypertrophie der Myozyten bei den Adipositätsmäusen in der vorliegenden Studie beeinflusste die Volumendichten der subzellulären Bestandteile (Myofibrillen, Mitochondrien, Sarkoplasma, Zellkerne) nicht wesentlich, was die Vermutung verstärkt, dass die prozentuale Zusammensetzung des Myokards bei fütterungsbedingter Herzhypertrophie nicht beeinflusst wird. Im Vergleich zu anderen Studien ist die Volumendichte der Myofibrillen, sowohl der Adipositas- als auch der Kontrolltiere, in der vorliegenden Studie relativ gering (Schaper et al. 1985, Barth et al. 1992). Grundsätzlich nimmt das Verhältnis von Mitochondrien zu Myofibrillen bei Nagern von

der Geburt bis zu einem Alter von über zwei Jahren stetig zu (Vandewoude und Buysens 1992a, David et al. 1981), so dass dies eine mögliche Erklärung für die relativ niedrige Volumendichte der Myofibrillen in der vorliegenden Studie sein könnte, denn die Mäuse hatten aufgrund der langen Versuchsdauer ein im Vergleich mit Tieren aus anderen Studien verhältnismäßig hohes Alter von ca. acht Monaten erreicht. Allerdings gibt es bezüglich dieses Aspekts auch andere Ergebnisse, denn bei zwei Jahre alten Ratten wurde eine Zunahme der Volumendichte der Myofibrillen um 10% festgestellt (Frenzel und Feimann 1984).

Während die absoluten Volumina von Myofibrillen, Sarkoplasma und Zellkernen zwar erhöht waren, jedoch lediglich in einem proportionalen Verhältnis zu der gesamten Herzhypertrophie, war das absolute Volumen der Mitochondrien bei den Adiposittieren der vorliegenden Studie signifikant erhöht. Vergleichbare andere Studien liefern zum Teil übereinstimmende, aber auch gegensätzliche Werte. Im Zusammenhang mit fütterungsbedingter Adipositas (rein fettreiche Fütterung) bei FVB-Mäusen wurde eine signifikante Reduktion der Volumendichte der Mitochondrien ermittelt (Dong et al. 2007). Abel ED et al. (2008) behaupten, dass Adipositas in verschiedenen Mausmodellen, wie zum Beispiel den db/db-Mäusen (Diabetes mellitus Typ II) oder den ob/ob-Mäusen (Mutation am Leptinrezeptorgen), mit einer erhöhten Anzahl der Mitochondrien assoziiert sei, es aber ebenfalls Hinweise auf eine vermehrte Dysfunktion der Mitochondrien gäbe. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, gibt es einen allometrischen Zusammenhang zwischen der Körpermasse und der Volumendichte der Mitochondrien bei Säugern, demnach sinkt mit zunehmender Körpermasse die Volumendichte der Mitochondrien (Schaper et al. 1985, Oron und Mandelberg 1985). Ginge man davon aus, dass diese Abnahme auch bei zunehmender Körpermasse innerhalb einer Tierspezies zutrifft, so müsste dies zu einer Abnahme der Volumendichte und des absoluten Volumens der Mitochondrien bei Adipositas führen. Da bei den adipösen Mäusen in der vorliegenden Studie das absolute Volumenn der Mitochondrien jedoch erhöht war, ist dieser allometrische Zusammenhang wohl nur für die Gewichtszunahme zwischen verschiedenen Spezies gültig.

Als mögliche Gründe für die unterschiedlichen Ergebnisse kommen mehrere Faktoren in Frage: die unterschiedlichen Spezies (Maus, Kaninchen) und Mausstämme (FVB,

C57Bl6, ob/ob, db/db), die unterschiedliche Fütterung bzw. Entstehung der Herzhypertrophie und die unterschiedlichen Methoden, die jeweils zur Bestimmung der Daten angewandt wurden. Beispielsweise ist das von Dong et al. (2007) ermittelte Ergebnis bezüglich der Volumendichte der Mitochondrien nicht direkt mit dem Ergebnis der vorliegenden Studie vergleichbar, da diese die Dichte der Mitochondrien ermittelt haben, indem sie die Anzahl der Mitochondrienquerschnitte pro Fläche gezählt haben, wobei aber die 3D Form der Mitochondrien nicht berücksichtigt wird (Mühlfeld et al. 2010a). Auf diese Weise können weder die Anzahl noch das absolute Volumen der Mitochondrien wiedergegeben werden, obwohl gerade das absolute Volumen der wichtigste Parameter ist, um die oxidative Kapazität des Gewebes auszudrücken (Hoppeler et al. 1984). Bemerkenswert ist auch, dass in dieser Studie gleichzeitig qualitative Veränderungen der Mitochondrien beschrieben wurden (Dong et al. 2007), was eine quantitative Auswertung erschwert.

Die Ultrastruktur des Myokards unterschied sich im Vergleich der beiden Versuchsgruppen nur durch die Akkumulation von größeren und weitaus zahlreicheren Lipidtropfen voneinander; die Volumendichte und das absolute Volumen der Lipidtropfen waren um das ca. 10fache erhöht, verglichen mit den Kontrolltieren. In zahlreichen anderen hypertrophen Herzen, bei leptin-defizienten Mäusen (Christoffersen et al. 2003, Dong et al. 2006), bei fütterungsbedingter Adipositas bei Ratten (Leopoldo et al. 2010), bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 (Borisov et al. 2008, Feuvray und Darmellah 2008) und bei Mäusen, die aufgrund eines Defektes am Hypothalamus adipös geworden waren (Chu et al. 1969), wurde diese Akkumulation von vermehrtem Fett in den Myozyten ebenfalls festgestellt. Zusätzlich wurden auch andere, zum Teil erhebliche Alterationen der Ultrastruktur der hypertrophen Myozyten beschrieben, wie z. B. Schwellung, Zerstörung und Verlust der Mitochondrien, Desorganisation der Cristae, Verlust oder Desorganisation der Myofilamente, stellenweise zerrissene Myofibrillen und dilatierte Vesikel des sarkoplasmatischen Retikulums (Chu et al. 1969, Christoffersen et al. 2003, Dong et al. 2006, Borisov et al. 2008, Feuvray und Darmellah 2008, Leopoldo et al. 2010). Interessanterweise war das Myokard der Versuchstiere in der vorliegenden Studie von solchen strukturellen Veränderungen nicht betroffen, auch die vermehrt vorkommenden Lipidtropfen waren in ihrer gewöhnlichen Lage nahe den

Mitochondrien zu finden. Allein jedoch die Lipid-Akkumulation in den Myozyten ist assoziiert mit einer Reihe von pathologischen Veränderungen, von denen vermutet wird, dass sie die Herzfunktion negativ beeinträchtigen können (Christoffersen et al. 2003, Sharma et al. 2004, Dong et al. 2006). Die diesen Veränderungen und Funktionsstörungen zugrunde liegenden Prozesse werden unter dem Begriff der Lipotoxizität zusammengefasst (Zhou et al. 2000, Borradaile und Schaffer 2005, Wende und Abel ED 2010). Obwohl die Mechanismen noch nicht vollständig geklärt sind, gibt es zahlreiche Hinweise darauf, dass es bei chronisch exzessiver Kalorienaufnahme zu einem sog. „spillover“ von Triglyzeriden im Blutserum kommt, da die Adipozyten nicht mehr in der Lage sind, diese zu speichern (Trivedi und Barouch 2008). Als Folge dessen werden die überzähligen Lipide von anderen Gewebearten, wie beispielsweise dem Myokard aufgenommen (Trivedi und Barouch 2008), was wiederum mit einer kontraktilen Dysfunktion der Myozyten assoziiert ist (Zhou et al. 2000, Young et al. 2002, Christoffersen et al. 2003, Young et al. 2002, Dong et al. 2006, Borradaile und Schaffer 2005, Wende und Abel ED 2010). Inwiefern die Lipide für die kontraktile Dysfunktion verantwortlich sind, ist noch weitgehend ungeklärt, man vermutet aber, dass die in Verbindung mit Lipidakkumulation auftretenden Veränderungen in der Genexpression dafür verantwortlich oder zumindest an diesem Mechanismus beteiligt sind (Sharma et al. 2004). Vor allem die Gene, die den „peroxisome proliferator-activated receptor α “, PPAR α , regulieren, werden bei Lipidakkumulation in den Zellen verstärkt exprimiert (Young et al. 2002, Zhou et al. 2002, Unger 2003), wobei dieser nukleare Rezeptor bei Aktivierung eine vermehrte Expression von Proteinen bewirkt, die die Aufnahme und Oxidation von Fettsäuren in die Zellen verstärken (Barger und Keller 2000). Bei Mäusen mit einem hohen Lipidspiegel im zirkulierenden Blut führte die Überexpression des PPAR α zu einer kardialen Dysfunktion (Sharma et al. 2004). Zudem wurde in Patienten mit Adipositas und Diabetes eine vermehrte Expression des Zytokins Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) in lipidüberladenem Gewebe festgestellt, wobei TNF- α direkt eine kontraktile Dysfunktion hervorrufen kann. Die Akkumulation von Lipiden in den Herzmuskelzellen führt außerdem dazu, dass toxische Lipidzwischenprodukte in den Zellen anfallen, die wiederum die Apoptose dieser hervorrufen können (Zhou et al. 2000, Listenberger und Schaffer 2002, Unger 2003). Zusätzlich wird vermutet, dass die

von den Adipozyten des weißen Fettgewebes sezernierten Faktoren, neben Leptin z. B. Adiponektin, eine große Rolle in der Entstehung von kardialer Dysfunktion und Remodelling spielen (Harmancey et al. 2008), vollkommen geklärt sind die hierfür verantwortlichen Mechanismen aber noch nicht.

Bemerkenswert ist der Befund einer Studie, bei der Ratten über sehr lange Zeit mit fettreichem Futter gefüttert wurden und diese trotz starker Lipidakkumulation weder eine kardiale Dysfunktion zeigten, noch eine durch lipotoxische Prozesse bedingte Apoptose festgestellt werden konnte (Nascimento et al. 2011), was vermuten lässt, dass bei rein fütterungsbedingter unkomplizierter Adipositas keine lipotoxischen Schäden entstehen. Dass eine kontraktile Dysfunktion und vermehrte Expression von Genprodukten, die die Aufnahme und Speicherung von Lipiden in der Zelle regulieren, auch in einer unkomplizierten Form von Adipositas auftreten kann, zeigten Christoffersen et al. (2003) in seiner Studie an Ratten, bei denen es sich allerdings um leptindefiziente Tiere handelte, was möglicherweise die Kontraktilität beeinflusst haben könnte. Wichtig ist die Vermutung von Trivedi und Barouch (2008), die auf Ergebnissen einiger Studien beruht, dass bei fütterungsbedingt adipösen Ratten keine Apoptose von Zellen auftritt. Dies bestätigt auch den Eindruck der qualitativen Beurteilung der vorliegenden Studie, in der keine apoptotischen Myozyten gefunden wurden. Es ist anzunehmen, dass viele Faktoren zusammen für die Entstehung von Lipotoxizität und Apoptose bei Adipositas verantwortlich sind, die im Näheren noch genau untersucht werden müssen.

4.2.1.4 Kapillaren

In Bezug auf die Versorgung des Gewebes durch Kapillaren wurden in der vorliegenden Studie die Längendichte und die absolute Länge der Kapillaren ermittelt, wobei die Längendichte der Kapillaren bei den Tieren der Adipositasgruppe im Vergleich zu den Kontrolltieren fast unverändert war, die absolute Länge dagegen signifikant zugenommen hatte. Dies lässt vermuten, dass die Kapillaren in einem proportionalen Verhältnis zu den Myozyten zugenommen haben und somit die aufgrund der Hypertrophie entstandene größere Diffusionsstrecke zwischen den Kapillaren und den Myozyten ausgeglichen haben. Diese Vermutung wird durch das unveränderte Verhältnis der absoluten Kapillarlänge zur absoluten Oberfläche der Myozyten bekräftigt. In einigen Studien

wurde lediglich die Kapillardichte (z. B. die Anzahl der Kapillaranschnitte pro Fläche eines Gewebequerschnittes) berechnet (Mall et al. 1990). Dies ist jedoch eine Größe, die nur eine Aussage über die 2D Anordnung der Kapillaren trifft, da nicht alle Kapillaräste parallel zu den Muskelfasern angeordnet sind, so dass es bei alleiniger Bestimmung der Kapillardichte leicht zu einer Unterschätzung der eigentlichen kapillaren Versorgung eines Gebietes führen kann (Mall et al. 1990). Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Studie die Längendichte und die absolute Länge der Kapillaren nach stereologischen Prinzipien ermittelt, was eine Berücksichtigung der 3D Orientierung gewährleistet (Mattfeldt und Mall 1984).

In der Literatur gibt es unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Auswirkungen einer Herzhypertrophie auf die Kapillarlänge. In Verbindung mit einer Hypertrophie aufgrund von leichtem Training bei Ratten (Anversa et al. 1983), chronischer Thyroxinverabreichung (Chilian et al. 1985, Mall et al. 1990) und Applikation des Wachstumshormons (Brüel et al. 2005) wurde eine Proliferation der Kapillaren festgestellt. Diese glich die erhöhte Diffusionsstrecke aus und stellte somit die Versorgung der Myozyten trotz Hypertrophie sicher. Bei einer durch hartes Training (Anversa et al. 1985) und Aortenkonstriktion (Rakusan et al. 1980) induzierten Hypertrophie, sowie bei einer auf einen Infarkt folgenden Hypertrophie (Anversa et al. 1986), war dagegen keine Proliferation der Kapillaren vorhanden. In diesem Zusammenhang war die Diffusionsstrecke deutlich erhöht, was eine Unterversorgung der Myozyten und ein erhöhtes Risiko für ischämische Infarkte vermuten lässt (Anversa et al. 1986).

Die Proliferation der Kapillaren, wie sie auch in der vorliegenden Studie eingetreten war, könnte entweder eine Verlängerung der bereits vorhandenen Gefäße bedeuten oder aber eine Neubildung von zusätzlichen Ästen. Mall et al. (1990) untersuchten dies bei Hypertrophie des Herzens aufgrund verschiedener Ursachen und fanden heraus, dass bei körperlicher Arbeit und chronischer Thyroxinverabreichung sehr wahrscheinlich eine Neubildung zusätzlicher Kapillaräste in paralleler Ausrichtung stattfindet. Dies ist bei normalem Wachstum ebenfalls der Fall (Mall et al. 1990), obwohl hierbei insgesamt die Kapillardichte im Vergleich zum postnatalen Stadium mit zunehmendem Wachstum abnimmt (Anversa et al. 1986). Grund für die Neubildung von Kapillaren ist

wahrscheinlich die erhöhte mechanische Belastung der Kapillaren, die durch den erhöhten Blutfluss verursacht wird (Mall et al. 1990). In der vorliegenden Studie hat die absolute Kapillarlänge signifikant zugenommen und zwar im Verhältnis zum absoluten Volumen der Myozyten, so dass die Diffusionsstrecke und damit die Versorgung des Gewebes unverändert blieben. Dies verstärkt die Annahme, dass es sich bei fütterungsbedingter Hypertrophie um einen proportionalen Wachstumsprozess handelt, bei dem die Zunahme der einzelnen Kompartimente in einem linearen Verhältnis verläuft und daher die Erhaltung der normalen Herzstruktur zumindest weitgehend gewährleistet ist. In den beschriebenen Fällen, in denen eine Hypertrophie aufgrund von Bluthochdruck zu keiner Proliferation der Kapillaren führte, fand auch in den anderen Kompartimenten des Myokards kein proportionales sondern unterschiedliches Wachstum der einzelnen Strukturen statt, beispielsweise war das Verhältnis von Mitochondrien zu Myozyten reduziert (Anversa et al. 1971, Anversa et al. 1986); bei hartem körperlichem Training dagegen war dieses Verhältnis teilweise erhöht oder aber auch unverändert, trotz gleichem Training (Anversa et al. 1982, Anversa et al. 1985). Bei Hypertrophie infolge eines Infarktes im Myokard wird ebenso eine Reihe von morphologischen Veränderungen beschrieben, die auf ein verändertes Verhältnis der einzelnen Strukturen und Kompartimente zueinander hindeuten (Schaper et al. 1986). Diese Befunde deuten auf eine veränderte morphologische Zusammensetzung des Myokards hin, der vermutlich andere Umbau- und Wachstumsprozesse als bei einer fütterungsbedingten Hypertrophie zugrunde liegen.

4.2.1.5 Innervation

Im Gegensatz zu Myozyten und Kapillaren war das Nervensystem bei den adipösen Tieren der vorliegenden Studie nicht von dem fütterungsbedingt linearen Wachstumsprozess betroffen. Die Ergebnisse von sowohl klinischen als auch experimentellen Studien haben gezeigt, dass Adipositas mit einer Dysfunktion des autonomen Nervensystems einhergeht, und zwar unabhängig von einer zusätzlichen Erkrankung an Diabetes mellitus (Valensi et al. 1995, Aronne et al. 1995, Silvani et al. 2010). Es wird im Zusammenhang mit unkomplizierter Adipositas eine Zunahme der sympathischen und eine gleichzeitige Abnahme der parasympathischen Kontrolle am

Herzen, sowie eine parasymphatische Dysfunktion des kardialen Nervensystems beschrieben (Aronne et al. 1995, Mackintosh und Hirsch 2001, Valensi et al. 2005). Als mögliche Ursachen werden beispielsweise eine erhöhte zirkulierende Insulinmenge (Liatis et al. 2004), ein hoher Anteil an Kohlenhydraten und ein geringer Anteil an Fett und Protein in der Nahrung (Liatis et al. 2004, Valensi et al. 2005), sowie eine erhöhte Leptinplasmakonzentration in Betracht gezogen, da Leptin nachweislich zu einer allgemein erhöhten Aktivität der sympathischen Nerven führt (Ren 2004, Havel 2000). Die näheren Zusammenhänge sind allerdings noch weitgehend ungeklärt, so dass die Hypothese entstanden war, dass morphologische Veränderungen des Nervensystems im Zusammenhang mit unkomplizierter Herzhypertrophie an der autonomen Dysfunktion beteiligt sein könnten. Die einzige morphologische Studie, bei der die Länge der Axone am Herzen bereits untersucht worden war, war an Tumormäusen mit Herztrophie durchgeführt worden und hat gezeigt, dass diese mit einer signifikanten Verringerung der absoluten Länge der Axone verbunden ist (Mühlfeld et al. 2011), so dass dies zusätzlich die Vermutung bestärkt hatte, eine fütterungsbedingte Hypertrophie gehe ebenfalls mit einer morphologischen Veränderung des Nervensystems, eventuell mit einer erhöhten Gesamtlänge der Axone, einher.

Die absolute Länge der Axone des linken Ventrikels war bei den Tieren der Adipositasgruppe zwar um den Faktor 1,34 größer als bei den Kontrolltieren – im Vergleich dazu war die Masse des linken Ventrikels bei den Adipositastieren lediglich um den Faktor 1,17 größer, der Mittelwert der absoluten Länge jedoch signifikant erhöht ($p=0,009$). Da es jedoch große Überschneidungen zwischen den Werten der einzelnen Tiere beider Gruppen gibt, ist dieser Unterschied nicht signifikant. Man kann also aufgrund der fehlenden Signifikanz in Bezug auf die absolute Länge der Axone lediglich eine zunehmende Tendenz im Zusammenhang mit fütterungsbedingter Herztrophie vermuten. Aufgrund der deutlichen Wertüberschneidungen der einzelnen Tiere ist die Wahrscheinlichkeit, dass es tatsächlich keinen biologischen Unterschied zwischen den beiden Tiergruppen gibt, höher, als die, dass die angewandte Methode zu ungenau war, um einen Unterschied zwischen Adipositas- und Kontrollgruppe zu ermitteln. Auch die weiteren zur Innervation ermittelten Parameter zeigten im Vergleich der beiden Tiergruppen keinen signifikanten Unterschied: Die lichtmikroskopisch bestimmte

Längendichte der Nervenfasern, die Anzahl der Axone pro Nervenfasern und die Anteile der sympathischen Nervenfasern an den gesamten Nervenfasern waren nicht signifikant verändert.

Bemerkenswert ist, dass experimentelle Alterationen des Nervensystems am Herzen, wie beispielsweise eine pharmakologische Sympathektomie oder eine chronische Blockade der β -Rezeptoren, die Volumendichte der Mitochondrien und die Kapillardichte beeinflussen, jedoch die Volumendichte der Myofibrillen unverändert bleibt (Tomanek 1989). In der vorliegenden Studie waren sowohl die Volumendichte als auch das absolute Volumen der Myofibrillen bei den Adipositas-Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren nicht signifikant verändert. Da in der vorliegenden Studie nur morphologische Daten erhoben wurden, kann jedoch keine Aussage über eventuelle funktionelle Beeinträchtigungen gemacht werden. Zudem gehen strukturelle Veränderungen des Nervensystems nicht zwangsläufig mit einer funktionellen Beeinträchtigung des Herzens einher: Bei einer aufgrund von Bluthochdruck erzeugten Hypertrophie des Herzens wurde eine Hyperinnervation mit sympathischen Nervenfasern ermittelt, wobei gleichzeitig auch ein Rückgang der neuronalen Zellfunktion festgestellt wurde, was bedeutete, dass zwar die Dichte der Nervenfasern erhöht, dafür jedoch ihre Aktivität herabgesetzt war (Kimura et al. 2006). Bei den bereits erwähnten tumorkachektischen Mäusen war trotz verringerter Gesamtlänge der Axone keine beeinträchtigte Ruhfunktion des Herzens festgestellt worden (Mühlfeld et al. 2011), was die Vermutung, dass strukturelle Veränderungen des Nervensystems nicht unbedingt mit funktionellen Störungen einhergehen, bestärkt.

Anhand der Ergebnisse der Immunfluoreszenz kann davon ausgegangen werden, dass der Anteil der sympathischen Nervenfasern an den gesamten Nervenfasern im Zusammenhang mit fütterungsbedingter Herzhypertrophie nicht verändert wird. Allerdings könnte auch eine Veränderung bezüglich der Expression der Rezeptoren an den Kardiomyozyten oder der Transmitter im Zellkörper der Neurone für die funktionelle Beeinträchtigung des autonomen Nervensystems und damit der Herzfunktion verantwortlich sein.

Zur weiteren Aufklärung des Zusammenhangs zwischen strukturellen Veränderungen der Innervation des Herzens und deren Auswirkungen auf die Herzfunktion würde sich eine

umfassende kombiniert morphologische und funktionelle Studie eignen, bei der das komplette kardiale Nervensystem mit den zugehörigen Ganglien und den entsprechenden Rezeptoren der Effektorzellen in Verbindung zur Herzfunktion untersucht wird.

4.2.2. Unterernährung

4.2.2.1 Entstehung einer Herzatrophie

Die Atrophie des Herzens bei den unterernährten Tieren der vorliegenden Studie war durch einen dem Gewichtsverlust entsprechenden proportionalen Abbauprozess gekennzeichnet, welcher sowohl das Kompartiment der Myozyten, als auch das der Kapillaren betraf, jedoch die Nervenfasern in ihrer Struktur nicht beeinflusste.

Obwohl die Mäuse der Versuchsgruppe Unterernährung weiterhin 50% ihrer normalen Tagesration bekommen hatten, war bereits nach sieben Tagen eine deutliche Atrophie des Herzens eingetreten. Das Gewicht des linken Ventrikels war um ca. 25% reduziert gegenüber dem der Kontrolltiere, die normal weitergefüttert worden waren. Eine Herzatrophie wird durch teilweisen (Okoshi et al. 2002, Gut et al. 2003) oder kompletten Nahrungsentzug (Vandewoude und Buysens 1992a) bzw. durch Mangelernährung wie Proteinmangel (Abel RM et al. 1979, Pissai et al. 1980) erzeugt. Weitere Ursachen sind Tumorerkrankungen (Tian et al. 2010, Mühlfeld et al. 2011, Sjöström et al. 1987) und Druckverminderung im Herzen, welche einerseits durch lange körperliche Inaktivität, wie beispielsweise Weltraumflüge oder Bettruhe (Perhonen et al. 2001), andererseits durch den Einsatz eines linksventrikulären Unterstützungssystems bei Herzpatienten (Kinoshita et al. 1996) oder durch eine experimentelle heterotope Isotransplantation hervorgerufen wird (Rakusan et al. 1997, Korecky und Masika 1990).

4.2.2.2 Verhältnis von linkem Ventrikel- zu Körpergewicht

Das Körpergewicht der unterernährten Mäuse der vorliegenden Studie war, verglichen mit den Kontrolltieren, zwar etwas stärker reduziert (32,4%) als das Gewicht des linken Ventrikels (25,2%), allerdings beeinflusste dies das Verhältnis von linkem Ventrikel- zu Körpergewicht nicht wesentlich, denn trotz Zunahme des Verhältnisses um den Faktor 1,16 war keine Signifikanz zu erkennen ($p=0,346$), was vermuten lässt, dass hier

aufgrund der Futterreduktion der Gewichts- und Abbauprozess in einem weitgehend proportionalem Verhältnis, bezogen auf das Gewicht von Körper und linken Ventrikel, stattgefunden hat.

Sechzig Tage alte Ratten wurden in zwei voneinander unabhängigen Studien mit Standardfutter ad libidum gefüttert, wobei täglich die aufgenommene Futtermenge ermittelt wurde und eine weitere Gruppe von Ratten von dieser Futtermenge jeweils genau 50% erhielt (Okashi et al. 2001, Gut et al. 2003). Nach drei Monaten wurde in der einen Studie ein weitgehend unverändertes Verhältnis (Gut et al. 2003) und in der anderen ein signifikant erhöhtes Verhältnis der beiden Größen um den Faktor 1,18 (Okashi et al. 2001) festgestellt. Eine mögliche Erklärung für diese unterschiedlichen Ergebnisse wäre, dass in den beiden Studien jeweils ein anderes Geschlecht verwendet wurde, was jedoch aus den Informationen nicht hervorgeht, denn man hat herausgefunden, dass zumindest ein atrophischer Prozess bei weiblichen Ratten deutlicher ausfällt als bei männlichen (Rakusan et al. 1997). Bei weiteren Untersuchungen an Ratten bezüglich Futterreduktion war nach ca. fünf Monaten ein signifikant erhöhtes Verhältnis von linkem Ventrikel- zu Körpergewicht ermittelt worden (Cappalli et al. 1990, Ameredes et al. 1998), so dass man davon ausgehen kann, dass sich nach ausreichend langer Zeit der Futterreduktion das Verhältnis des Gewichts des linken Ventrikels zum Körpergewicht deutlich erhöht, wobei diese Tendenz bei den Tieren der vorliegenden Studie bereits zu erahnen ist.

Im Zusammenhang mit proteinarmer Ernährung (4% statt 16%) bei normalem Kaloriengehalt, wurde bei Ratten ein signifikant erhöhtes Verhältnis von linkem Ventrikel- zu Körpergewicht im Vergleich zu normal gefütterten Ratten ermittelt (Pissaia et al. 1980, Rossi und Zucoloto 1982). Ebenfalls ein signifikant erhöhtes Verhältnis dieser beiden Größen wurde bei Herzatrophie im Zusammenhang mit Tumorkachexie (Mühlfeld et al. 2011) und bei Ratten, die für zehn Tage unter vollständigem Futterentzug gehalten worden waren (Vandewoude und Buysens 1992a), festgestellt. Vandewoude und Buysens (1992a) haben die Hypothese aufgestellt, dass die Gewichtsabnahme am Herzen in zwei Phasen verläuft. In der ersten Phase verliert das Herz sehr schnell Gewicht, weshalb in dieser Phase das Verhältnis zum Körpergewicht zunimmt, bis ab einem gewissen Punkt das Herz gegenüber anderen Organen geschützt wird, so dass sich

der Wert des Verhältnisses auf einem hohen Wert stabilisiert und erst in der letzten Phase des Hungerns, wenn alle Energiereserven aufgebraucht sind, genauso atrophisch wird wie alle anderen Organe (Vandewoude et al 1988). Wie genau die Gewichtsabnahme des Herzens bzw. des linken Ventrikels bei Futterreduktion verläuft, müsste in einem Versuch über einen längeren Zeitraum mit regelmäßiger Erhebung der Gewichte des linken Ventrikels und der Körpergewichte untersucht werden. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse im Vergleich mit anderen Studien kann man nur vermuten, dass in der ersten Phase der Futterreduktion die Gewichtsabnahme in proportionalem Verhältnis erfolgt und später vermutlich mehr den Körper als das Herz betrifft.

Allerdings ist diese anfängliche proportionale Gewichtsabnahme bei atrophischen Prozessen im Zusammenhang mit totalem Nahrungsentzug, Proteinmangel und Tumorkachexie nicht vorhanden, hier scheint von Anfang an ein erhöhtes Verhältnis vorhanden zu sein, was eventuell damit zu erklären ist, dass sowohl einem kompletten Futterentzug als auch einer Tumorkachexie und einem Proteinmangel andere pathologische Prozesse zugrunde liegen. Grundsätzlich können die Ursachen für Atrophie des Herzens in zwei Bereiche eingeteilt werden, nämlich erstens in metabolische Nicht-Belastung, die im Zusammenhang mit reduzierter Nahrung bzw. Nahrungsentzug auftritt und zweitens die hämodynamische Nicht-Belastung, die bei langer körperlicher Inaktivität, durchgetrenntem Papillarmuskel oder heterotroper Transplantation des Herzens zu finden ist (Baskin und Taegtmeier 2011). Allerdings ist dabei eine Atrophie im Zusammenhang mit Kachexie, die meist in Verbindung mit anderen Primärerkrankungen wie z. B. Tumorerkrankungen auftritt, nicht ausreichend mit berücksichtigt, da diese eine Folge chronisch systemischer Entzündung ist (Martignoni et al. 2003).

4.2.2.3 Myokard und Kardiomyzyten

Die weitgehend unveränderten Volumendichten von Myozyten und Interstitium im linken Ventrikel bestätigen, dass sich die prozentualen Anteile dieser beiden Strukturen bei fütterungsbedingter Atrophie ebenfalls nicht verändern, sondern gleichermaßen vom Abbauprozess betroffen sind. Dementsprechend sind die absoluten Volumina von Myozyten und Interstitium signifikant reduziert. In einer Studie an heterotop

transplantierten Herzen, die dadurch über einen langen Zeitraum von 90 Tagen unbelastet waren und deshalb atrophisch geworden waren, konnte dieselbe proportionale Abnahme von Myozyten und Interstitium festgestellt werden (Brinks et al. 2009). Vergleichbare Daten wurden auch bei Ziegen mit linksventrikulärem Unterstützungssystem ermittelt (Kinoshita et al. 1988). Ein linksventrikuläres Unterstützungssystem hat prinzipiell denselben Effekt wie eine heterope Transplantation, nämlich eine Nicht-Belastung des Herzens (Kinoshita et al. 1988). Die Ergebnisse im Zusammenhang mit Nahrungsreduktion und einer Nicht-Belastung des Herzens stehen im Widerspruch zum totalen Nahrungsentzug, denn dort findet ein nicht-proportionaler Umbauprozess statt, bei dem die Volumendichte der Myozyten signifikant ansteigt (Vandewoude und Buysens 1992a). Genau das Gegenteil trat bei proteinarmer Ernährung ein, hier war die Volumendichte der Myozyten signifikant reduziert (Pissaia et al. 1980). Eine mögliche Erklärung für diese unterschiedlichen Ergebnisse sind vermutlich die verschiedenen pathologischen Prozesse und die damit verbundenen unterschiedlichen Ursachen, die der Atrophie zugrunde liegen, wobei jedoch auch das unterschiedliche Geschlecht und die Spezies eine Rolle spielen können. Es wurde herausgefunden, dass weibliche Ratten bei Nicht-Belastung des Herzens mit einer stärkeren Atrophie reagieren als männliche Ratten (Rakusan et al. 1997).

Die subzellulären Bestandteile der Myozyten in den atrophischen Herzen der vorliegenden Studie waren bezüglich ihrer Volumendichte relativ unverändert geblieben. So waren die absoluten Volumina von Mitochondrien, Sarkoplasma und Myofibrillen deutlich kleiner als bei den Kontrolltieren, lediglich das absolute Volumen der Zellkerne blieb unverändert. Dies veranschaulicht, dass bei fütterungsbedingter Atrophie auch intrazellulär ein proportionaler Abbau stattfindet. Die Tatsache, dass das absolute Volumen der Zellkerne nicht abgenommen hat, könnte darauf hinweisen, dass sich die Größe der Myozyten, jedoch nicht ihre Anzahl verändert hat, so dass aus diesem Grund das Volumen der Zellkerne erhalten blieb. Ein weiterer Grund ist die ohnehin schon sehr geringe Dichte der Zellkerne, so dass beim Auszählen insgesamt weniger Punkte auf Zellkerne fielen, wodurch die Genauigkeit geringer als bei den anderen Parametern war und sich somit auch höhere individuelle Schwankungen bei den einzelnen Tieren ergeben

haben könnten. Die qualitative Untersuchung der Ultrastruktur des Myokards und der Kardiomyozyten ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tieren der Unterernährungs- und der Kontrollgruppe. Bei chronisch unterernährten Ratten, die über einen Zeitraum von 90 Tagen, also mehr als 12 mal so lang wie die Mäuse der vorliegenden Studie, nur jeweils 50% der Futtermenge der Kontrolltiere erhalten hatten, wurden fokal ultrastrukturelle Veränderungen festgestellt: Verlust und/oder Desorganisation der Myofibrillen, polymorphe Mitochondrien, teilweise geschwollen und mit desorganisierten Cristae, tiefe Einstülpungen der Plasmamembran und eine deutliche Zunahme des Bindegewebes (Okashi et al. 2001, Sugizaki et al. 2005). Vermutlich sind diese Alterationen auf den erheblich längeren Zeitraum des Versuches zurückzuführen. Auch bei Herzatrophie im Zusammenhang mit proteinarmer Ernährung wurden zum Teil erhebliche strukturelle Veränderungen gefunden, vor allem interstitielle Ödeme (Oumi und Yamamoto 1999, Piassia et al. 1980, Abel RM et al. 1979), die mit ein Grund dafür sein könnten, dass das Gewicht des Herzens bzw. des linken Ventrikels relativ hoch war und dadurch auch das Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht. Außerdem deuten diese morphologischen Veränderungen auf einen anderen pathologischen Prozess hin. Im Gegensatz dazu war bei Tumorkachexie die Volumendichte der Myofibrillen signifikant reduziert und die Volumendichte des Sarkoplasmas signifikant erhöht, dass sogar intrazellulär ein deutlich verändertes Verhältnis der einzelnen zellulären Bestandteile vorlag. Erstaunlicherweise war trotz dieses gestörten Verhältnisses die Ruhfunktion des Herzens bei diesen Tumormäusen nicht verändert (Mühlfeld et al. 2011).

Quantitativ wurde bei totaler Nahrungsrestriktion in Bezug auf die Volumendichte der Zellkerne keine Veränderung, dafür aber eine signifikant reduzierte Volumendichte der Mitochondrien und eine reziproke Zunahme der Volumendichte der Myofibrillen ermittelt, so dass das Verhältnis von Mitochondrien zu Myofibrillen stetig abnahm (Vandewoude und Buysens 1992a). Dies zeigt wiederum, dass der atrophische Prozess bei totalem Nahrungsentzug nicht mit dem bei einer Futterreduktion ablaufenden Prozess zu vergleichen ist.

4.2.2.4 Kapillaren

Die Kapillaren der unterernährten Mäuse der vorliegenden Studie waren von dem atrophischen Prozess gleichermaßen betroffen wie die Myozyten, was durch die weitgehend unverändert gebliebene Längendichte der Kapillaren zum Ausdruck kommt. Nimmt man den Kehrwert dieses Parameters, so erhält man einen unabhängigen Wert, der die Fläche der Myozyten angibt, die von einer Kapillare versorgt wird. Da dieser Wert entsprechend der Längendichte der Kapillaren bei den unterernährten Tieren nicht signifikant verändert war, zeigt dies, dass die Diffusionsstrecke für Sauerstoff und andere Nährstoffe von der Kapillarwand zu den Myozyten gleich geblieben ist. Die signifikant reduzierte absolute Länge der Kapillaren bestätigt, dass diese ebenso in den atrophischen Prozess involviert waren wie die Myozyten.

Diese Befunde sind wiederum gegensätzlich zu den Ergebnissen bei totaler Nahrungskarenz: im Zusammenhang mit vollständigem Nahrungsentzug wurde bei Ratten eine signifikante Verkürzung der Diffusionsstrecke für Metaboliten festgestellt, was auf ein gestörtes Verhältnis von Myozyten und Kapillaren zueinander schließen lässt (Vandewoude 1995). Als mögliche Ursachen für diese unterschiedlichen Ergebnisse kommen hierbei die bereits oben aufgeführten Aspekte in Frage.

Im Zusammenhang mit einer durch heterotope Isotransplantation induzierten Herzatrophie war sowohl die Dichte der Myozyten als auch die der Kapillaren signifikant erhöht (Rakusan et al. 1997). Da jedoch die Dichte der Kapillaren weniger stark erhöht war, hatte sich trotzdem ein signifikant reduziertes Verhältnis von Kapillaren und Myozyten eingestellt (Rakusan et al. 1997), was auf eine größer gewordene Diffusionsstrecke hindeutet und die Vermutung liegt nahe, dass eine Unterversorgung der Myozyten vorlag. Die Befunde bei durch Tumorkachexie hervorgerufener Atrophie zeigen, dass dort die Myozyten stets vom Umbauprozess der Atrophie betroffen sind (Burch et al. 1968, Sjöström et al. 1987, Tian et al. 2010, Mühlfeld et al. 2011), die Kapillaren jedoch nicht (Sjöström et al. 1987), was ebenfalls auf ein gestörtes Verhältnis dieser beiden Kompartimente zueinander hindeutet.

Festzuhalten bleibt, dass in der vorliegenden Studie sowohl die Myozyten als auch die Kapillaren weitgehend proportional vom atrophischen Abbauprozess betroffen waren, woraus die Vermutung entsteht, dass diese beiden Kompartimente in enger Verbindung

zueinander stehen und diese Beziehung bei fütterungsbedingter Atrophie nicht beeinträchtigt wird, was einen grundsätzlichen Unterschied zu Atrophien anderer Ursachen darstellt.

4.2.2.5 Innervation

Die Innervation des Herzens stellt in der vorliegenden Studie das einzige untersuchte Kompartiment dar, welches vom atrophischen Abbauprozess unbeeinflusst blieb. Sowohl die absolute Länge der Axone, als auch die Längendichte der Nervenfasern waren bei den Tieren mit Herzatrophie im Vergleich zu den Kontrolltieren nicht signifikant verändert und auch die Anteile der sympathischen Nervenfasern in den Vorhöfen wiesen keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen auf.

Die einzige quantitative morphologische Untersuchung des Nervensystems bei Herzatrophie wurde in der bereits mehrfach erwähnten Studie an tumorkachektischen Mäusen durchgeführt, bei denen eine verringerte Gesamtlänge der Axone im linken Ventrikel ermittelt worden war (Mühlfeld et al. 2011). Während bei Atrophie im Zusammenhang mit Tumorkachexie in Ruhe keine Beeinträchtigung der Herzfunktion festgestellt werden konnte (Mühlfeld et al. 2011), wird bezüglich einer Herzatrophie im Zusammenhang mit Anorexia nervosa eine gestörte autonome Kontrolle des Herzens beschrieben (Kollai et al. 1994, Rechlin et al. 1998, Murialdo et al. 2007) und diese sogar mit dem bei dieser Krankheit auftretenden plötzlichen Herztod assoziiert (Platisa et al. 2006).

Die Tatsache, dass bei den unterernährten Tieren der vorliegenden Studie keine strukturellen Veränderungen des Nervensystems bestehen, bedeutet nicht, dass auch bezüglich der Regulation und Funktion des autonomen Nervensystems keine Veränderung vorliegt. Das signifikant reduzierte Volumen der Myozyten bei gleichzeitig unveränderter Gesamtlänge der Axone bei den unterernährten Tieren führte zu einem veränderten Verhältnis dieser Kompartimente zueinander, was eventuell eine Hyperinnervation des linken Ventrikels bedeuten könnte. Bei Mäusen mit einer Hyperinnervation des Herzens aufgrund vermehrter Expression von nervalem Wachstumsfaktor war diese nicht mit einer funktionellen Beeinträchtigung assoziiert (Kiriazis et al. 2005), was vermuten lässt, dass eine strukturelle Veränderung des

kardialen Nervensystems bei Atrophie nicht zwangsläufig mit einer Dysfunktion einhergeht.

4.3 Ausblick

Da es sich um die erste Studie handelt, die im Zusammenhang mit fütterungsbedingter Hyper- und Atrophie die Innervation des Herzens morphologisch untersucht hat, gibt es keine vergleichbaren Daten und es kann keine Aussage über einen möglichen Zusammenhang der strukturell unveränderten Innervation und der Auswirkung dessen auf die Funktion des autonomen Nervensystems bzw. auf die Herzfunktion gemacht werden. Aus diesem Grund sind weitere Untersuchungen bezüglich des direkten Zusammenhangs von morphologischen und funktionellen Veränderungen bei fütterungsbedingter Hyper- und Atrophie des Herzens notwendig. Auch bezüglich der Hyper- und Atrophieformen anderer Ursachen wären morphologische Untersuchungen der Innervation hilfreich. Die verschiedenen Formen und die zugrunde liegenden pathologischen Prozesse könnten dann besser erklärt und differenziert werden.

Wichtig ist dabei, dass bei Untersuchungen der Innervation das gesamte autonome Nervensystem des Herzens in die Untersuchung mit einbezogen wird, denn eventuelle Veränderungen könnten beispielsweise auch in den zugehörigen prä- und postsynaptischen Ganglien oder den Rezeptoren der Effektorzellen, den Kardiomyozyten, zu finden sein.

5. Zusammenfassung

Eine durch Adipositas hervorgerufene Herzhypertrophie ist, ebenso wie eine ernährungsbedingte Herzatrophie, mit morphologischen Veränderungen und einer Dysfunktion des Herzens assoziiert. Allerdings wurden sowohl eine ernährungsbedingte Hyper- als auch eine Atrophie meist in Verbindung mit anderen Komorbiditäten untersucht.

Es liegen bislang keine quantitativen Daten bezüglich der Innervation bei ernährungsbedingter Hyper- und Atrophie vor. Lediglich bei einer durch Tumorkachexie induzierten Herzatrophie wurde eine Verringerung der Gesamtlänge der Axone im linken Ventrikel ermittelt und bei einer durch Bluthochdruck erzeugten Herzhypertrophie wurde eine Hyperinnervation festgestellt.

In der vorliegenden Studie wurden zum ersten Mal Veränderungen der drei Kompartimente des linken Ventrikels - Kardiomyozyten, Kapillaren und Innervation – bei ernährungsbedingter Hyper- und Atrophie bei der Maus untersucht und in einen Zusammenhang zueinander gestellt. Die Innervation des linken Ventrikels wurde an diesem Mausmodell zum ersten Mal überhaupt quantitativ erfasst.

Mit der Methode der Stereologie wurden das Volumen der Kardiomyozyten und ihrer subzellulären Bestandteile, die absolute Länge der Kapillaren und die absolute Länge der Axone im linken Ventrikel bestimmt und statistisch auf signifikante Unterschiede im Vergleich zu normalgewichtigen Mäusen ausgewertet. Zusätzlich wurde mittels Immunfluoreszenz der Anteil der sympathischen Nervenfasern im Vergleich zu den gesamten Nervenfasern in den Vorhöfen bestimmt.

Die Versuche wurden an C57BL/6 Mäusen durchgeführt. Zur Erzeugung der Adipositas wurden die Tiere über einen Zeitraum von sechs Monaten mit einem fett- und kohlenhydratreichen Futter gefüttert und zur Erzeugung der Unterernährung wurde die tägliche Futterration für sieben Tage auf 50% reduziert.

Die ernährungsbedingte Herzhypertrophie war mit einer signifikanten Zunahme des absoluten Volumens der Myozyten und einer signifikant erhöhten absoluten Länge der Kapillaren verbunden, während die absolute Länge der Axone nicht signifikant verändert war. Dies deutet darauf hin, dass ein enges Verhältnis zwischen den Kardiomyozyten und

den Kapillaren besteht, das auch bei ernährungsbedingter Hypertrophie nicht verloren geht, von dem aber die Innervation nicht betroffen zu sein scheint.

Bei der ernährungsbedingten Atrophie des Herzens wurde dasselbe proportionale Verhältnis zwischen Myozyten und Kapillaren gefunden, das jedoch hier in umgekehrter Weise verändert war: Das absolute Volumen der Myozyten und die absolute Länge der Kapillaren waren signifikant reduziert. Die absolute Länge der Axone im Vergleich zu den normalgewichtigen Tieren war jedoch nicht verändert.

Man geht also davon aus, dass sowohl bei ernährungsbedingter Hyper- als auch Atrophie des Herzens ein proportionaler Wachstums- bzw. Abbauprozess stattfindet, der die Kompartimente von Myozyten und Kapillaren im gleichen Verhältnis betrifft, während die Innervation strukturell unbeeinflusst bleibt. Welche Auswirkungen dies auf die Funktion des Herzens und des autonomen Nervensystems hat, ist unklar und muss durch weiterführende Untersuchungen ermittelt werden.

6. Literaturverzeichnis

Abel ED, Litwin SE, Sweeney G: Cardiac remodelling in obesity. *Physiol Rev* 88: 389-419 (2008).

Abel RM, Grimes JB, Alonso M, Gay WA Jr.: Adverse hemodynamic and ultrastructural changes in dog hearts subjected to protein-calorie malnutrition. *Am Heart J* 97: 733-744 (1979).

Alpert MA: Obesity cardiomyopathy: pathophysiology and evolution of the clinical syndrome. *Am J Med Sci* 321: 225-236 (2001).

Amad KH, Brennan JC, Alexander JK: The cardiac pathology of chronic exogenous obesity. *Circulation* 32: 740-745 (1965).

Ameredes BT, Dadood MJ, Watchko JF: Refeeding reverses cardiac myosin shifts induced by undernutrition in aged rats: modulation by growth hormone. *J Mol Cell Cardiol* 30: 1525-1533 (1998).

Amour JA: Potential clinical relevance of the „little brain“ on the mammalian heart. *Exp. Physiol* 93: 165-176 (2008).

Amour JA, Murphy DA, Yuan BX, Macdonald S, Hopkins DA: Gross and microscopic anatomy of the human intrinsic cardiac nervous system. *Anat Rec* 247: 289-298 (1997).

Anversa P, Vitali-Mazza L, Visioli O, Marchetti G: Experimental cardiac hypertrophy: a quantitative ultrastructural study in the compensatory stage. *J Mol Cell Cardiol* 3: 213-227 (1971).

Anversa P, Loud AV, Giacomelli F, Wiener J: Absolute morphometric study of myocardial hypertrophy in experimental hypertension. II. Ultrastructure of myocytes and interstitium. *Lab Invest* 38: 597-609 (1978).

Anversa P, Beghi C, Levicky V, McDonald SL, Kikkawa Y: Morphometry of right ventricular hypertrophy induced by strenuous exercise in rat. *Am J Physiol* 243: H856-H861 (1982).

Anversa P, Levicky V, Beghi C, McDonald SL, Kikkawa Y: Morphometry of exercise-induced right ventricular hypertrophy in the rat. *Circ Res* 52: 57-64 (1983).

Anversa P, Beghi C, Levicky V, McDonald SL, Kikkawa Y, Olivetti G: Effects of strenuous exercise on the quantitative morphology of the left ventricular myocardium in the rat. *J Mol Cell Cardiol* 17: 587-595 (1985).

Anversa P, Beghi C, Kikkawa Y, Olivetti G: Myocardial infarction in rats. Infarct size, myocyte hypertrophy, and capillary growth. *Circ Res* 58: 26-37 (1986).

Aronne LJ, Mackintosh R, Rosenbaum M, Leibel RL, Hirsch J: Autonomic nervous system activity in weight gain and weight loss. *Am J Physiol* 269: R222-R225 (1995).

Ashrafian H, Athanasiou T, Le Roux CW: Heart remodelling and obesity: the complexities and variation of cardiac geometry. *Heart* 97: 171-172 (2011).

Aubin MC, Cardin S, Comtois P, Clément R, Gosselin H, Gillis MA, Le Quang K, Nattel S, Perrault LP, Calderone A: A high-fat diet induced increases risk of ventricular arrhythmia in female rats: enhanced arrhythmic risk in the absence of obesity or hyperlipidemia. *J Appl Physiol* 108: 933-940 (2010).

Avelar E, Cloward TV, Walker JM, Farney RJ, Strong M, Pendleton RC, Segerson N, Adams TD, Gress RE, Hunt SC, Litwin SE: Left ventricular hypertrophy in severe obesity: interactions among blood pressure, nocturnal hypoxemia, and body mass. *Hypertension* 49: 34-39 (2007).

Baddeley AJ, Gundersen HJG, Cruz-Orive LM: Estimation of surface area from vertical sections. *J Microsc* 142: 259-276 (1986).

Balercia G, Canon C, Marabello G, Dantchev D, Mathé G: Immunoelectron microscopy with immunogold staining method and monoclonal antibodies. A promising tool in ultrastructural study of lymphatic subpopulations. *Biomed Pharmacother* 38: 114-116 (1984).

Barger PM, Keller DP: PPAR signaling in the control of cardiac energy metabolism. *Trends Cardiovasc Med* 10: 238-245 (2000).

Barth E, Stämmler G, Speiser B, Schaper J: Ultrastructural quantitation of mitochondria and myofilaments in cardiac muscle from 10 different animal species including man. *J Mol Cell Cardiol* 24, 669-681 (1992).

Bennett MR, McLachlan EM: An electrophysiological analysis of the storage of acetylcholine in preganglionic nerve terminals. *J Physiol* 221: 657-68 (1972).

Borisov AB, Ushakov AV, Zagorulko AK, Novikov NY, Selivanova, Edwards CA, Russell MW: Intracardial lipid accumulation, lipotrophy of muscle cells and expansion of myocardial infarction in type 2 diabetic patients. *Micron* 39: 944-951 (2008).

Borradaile NM, Schaffer JE: Lipotoxicity in the heart. *Curr Hypertens Rep* 7: 412-417 (2005).

Bouchard C, Tremblay A: Genetic influence on the response of body fat and fat distribution to positive and negative energy balances in human identical twins. *J Nutr* 127: 943S-947S (1997).

Breisch EA, Houser SR, Carey RA, Spann JF, Bove AA: Myocardial blood flow and capillary density in chronic pressure overload of the feline left ventricle. *Cardiovasc Res* 14: 469-475 (1980).

Brinks H, Tevaearai H, Mühlfeld C, Bertschi D, Gahl B, Carrel T, Giraud M-N: Contractile function is preserved in unloaded hearts despite atrophic remodelling. *J Thorac Cardiovas Surg* 137: 742-746 (2009).

Brüel A, Oxlund H, Nyengaard JR: The total length of myocytes and capillaries, and total number of myocyte nuclei in the rat heart are time-dependently increased by growth hormone. *Growth Horm IGF Res* 15: 256-264 (2005).

Burch GE, Phillips JH, Ansari A: A clinico-pathologic, electrocardiographic and roentgenographic entity. *Dis Chest* 54: 403-409 (1968).

Burkholder WJ, Toll PW. Obesity. In: Hand MS, Thatcher CD, Reinmillard RL, Roudebush P, Morris ML, Novotny BJ, editors. *Small animals clinical nutrition*, 4. Auflage. Topeka, KS: Mark Morris Institute; S. 401-430 (2000).

Campbell HJ, Korecky B, Rakusan K: Remodeling of myocyte dimensions in hypertrophic and atrophic rat hearts. *Circ Res* 68: 984-996 (1991).

Canale ED, Campbell GR, Smolich JJ, Campbell HJ: Cardiac Muscle; in: Handbook of Microscopic Anatomy, vol II/7; hrsg. v. Oksche A, Vollrath L; Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1-318 (1986).

Cappelli V, Bottinelli R, Reggiani C: Altered contractile properties of rat cardiac muscle during experimental thiamine deficiency and food deprivation. *J Mol Cell Cardiol* 22: 1095-1106 (1990).

Carroll JF, Zenebe WF, Strange TB: Cardiovascular function in a rat model of diet-induced obesity. *Hypertension* 48: 66-72 (2006).

Caulfield JB, Borg TK: The collagen network of the heart. *Lab Invest.* 40: 364-372 (1979).

Chan WC, Koelmeyer T: Polysarcia adipose: morbid obesity. *Am J Forensic Med Pathol* 28: 249-254 (2007).

Chess DJ, Lei B, Hoit BD, Azimzadeh AM, Stanley WC: Effects of high saturated fat diet on cardiac hypertrophy and dysfunction in response to pressure overload. *J Card Fail* 14: 82-88 (2008).

Cheung DT, Perelman N, Ko EC, Nimni ME: Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde III. Reaction with collagen in tissues. *Connect Tissue Res* 13: 109-115 (1985).

Chilian WM, Wangler RD, Peters KG, Tomanek RJ, Markus ML: Thyroxine-induced left ventricular hypertrophy in the rat. Anatomical and physiological evidence for angiogenesis. *Circ Res* 57: 591-598 (1985).

Christoffersen C, Bollano E, Lindegaard MLS, Bartels ED, Goetze JP, Andersen CB, Nielsen LB: Cardiac lipid accumulation associated with diastolic dysfunction in obese mice. *Endocrinology* 144: 3483-3490 (2003).

Chu KC, Sohal RS, Sun SC, Burch GE, Colcolough HL: Lipid cardiomyopathy of the hypertrophied heart of goldthioglucose obese mice. *J Pathol* 97: 99-103 (1969).

Cruz-Orive LM, Weibel ER: Recent stereological methods for cell biology: a brief survey. *Am J Physiol* 258: L148-L156 (1990).

David H, Bóznér A, Meyer R, Wassilew G: Pre- and postnatal development and ageing of the heart: Ultrastructural results and quantitative data. VEB Gustav Fischer Verlag, Experimental Pathology, Suppl. 7, 1st edition, Seite 149 (1981).

de Simone G, Devereux RB, Roman MJ, Alderman MH, Laragh JH: Relation of obesity and gender to left ventricular hypertrophy in normotensive and hypertensive adults. *Hypertension* 23: 600-606 (1994a).

de Simone G, Scalfi L, Galderisi M, Celentano A, Di Biase G, Tammaro P, Garofalo M, Mureddu GF, de Divitiis O, Contaldo F: Cardiac abnormalities in young women with anorexia nervosa. *Br Heart J* 71: 287-292 (1994b).

Després JP: Is visceral obesity the cause of the metabolic syndrome? *Ann Med* 38: 52-63 (2006).

Dobson GP: On being the right size: Heart design, mitochondrial efficiency and lifespan potential. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30: 590-597 (2003).

Dong F, Zhang X, Yang X, Esberg LB, Yang H, Zhang Z: Impaired cardiac contractile function in ventricular myocytes from leptin-deficient ob/ob obese mice. *J Endocrinol* 188: 25-36 (2006).

Dong F, Li Q, Sreejayan N, Nunn JM, Ren J: Metallothionein prevents high-fat diet induced cardiac contractile dysfunction of peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1alpha and mitochondrial biogenesis. *Diabetes* 56: 2201-2212 (2007).

Dorph-Petersen KA, Nyengaard JR, Gundersen JG: Tissue shrinkage and unbiased stereological estimation of particle number and size. *J Microsc* 204: 232-246 (2001).

Edney AT, Smith PM: Study of obesity in dogs visiting veterinary practices in the United Kingdom. *Vet Rec* 118: 391-396 (1986).

Eldred WD, Zucker C, Karten HJ, Yazulla S: Comparison of fixation and penetration enhancement techniques for use in ultrastructural immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem* 31: 285-292 (1983).

Ellison JP, Hibbs RG: An ultrastructural study of mammalian cardiac ganglia. *J Mol Cell Cardiol* 8: 89-101 (1976).

- Fang CX, Dong F, Thomas DP, Ma H, He L, Ren J: Hypertrophic cardiomyopathy in high-fat diet-induced obesity: role of suppression of forkhead transcription factor and atrophy gene transcription. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295: H1206-H1215 (2008).
- Ferrans VJ, Thiedemann KU: Ultrastructure of the normal heart; in: *Cardiovascular Pathology*, Band 1, hrsg. v. Silver MD; Churchill Livingstone Publishing, New York, S 31-86 (1983).
- Feuvray D, Darmellah A: Diabetes-related metabolic perturbations in cardiac myocyte. *Diabetes Metab* 34: S3-S9 (2008).
- Forbes MS, Sperelakis N: Association between mitochondria and gap junctions in mammalian myocardial cells. *Tissue Cell* 14: 25-37 (1982).
- Forssmann WG, Girardier L: A study of the T-system in rat heart. *J Cell Biol* 44: 1-19 (1970).
- Frenzel H, Feimann J: Age-dependent structural changes in the myocardium of rats. A quantitative light- and electron-microscopic study on the right and left chamber wall. *Mech Aging Dev* 27: 29-41 (1984).
- Friedmann JM: Obesity in the new millennium. *Nature* 404: 632-634 (2000).
- German AJ: The growing problem of obesity in dogs and cats. *J Nutr* 136: 1940S-1946S (2006).
- Goldberg SJ, Comerci GD, Feldman L: Cardiac output and regional myocardial contraction in anorexia nervosa. *J Adolesc Health Care* 9: 15-21 (1988).
- Gulbenkian S, Wharton J, Polak JM: The visualisation of cardiovascular innervation in the guinea pig using an antiserum to protein gene product 9.5 (PGP 9.5). *J Auton Nerv Syst* 18: 235-247 (1987).
- Gundersen HJ: Notes of the estimation of the numerical density of arbitrary profiles. *J Microsc* 111: 219-223 (1977).
- Gundersen HJ, Jensen EB: The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc.* 147: 229-263 (1987).

Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sørensen FB, Vesterby A, West MJ: Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 96: 379-394 (1988).

Gut AL, Okoshi MP, Padovani CR, Aragon FF, Cicogna AC: Myocardial dysfunction induced by food restriction is related to calcium cycling and beta-adrenergic system changes. *Nutr Res* 23: 911-919 (2003).

Hackenbrock CR: Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. I. Reversible ultrastructural changes with change in metabolic steady state in isolated liver mitochondria. *J Cell Biol* 30: 269-297 (1966).

Harmancey R, Wilson CR, Teagtmeyer H: Adaptation and maladaptation of the heart in obesity. *Hypertension* 52: 181-187 (2008).

Havel PJ: Role of adipose tissue in body-weight regulation: mechanisms regulating leptin production and energy balance. *Proc Nutr Soc* 59: 359-371 (2000).

Hayat MA: Fixation for electron microscopy. Academic press, New York, 66-129 (1981).

Hayat MA: Glutaraldehyde: Role in electron microscopy. *Micron and Microscopica Acta* 17: 115-135 (1986).

Hökfelt T, Bartfai T, Bloom F: Neuropeptides: Opportunities for drug discovery. *Lancet Neurol* 2: 463-472 (2003).

Hoenig M, Ferguson DC: Effects of neutering on hormonal concentrations and energy requirements in male and female cats. *Am J Vet Res* 63: 634-639 (2002).

Hopkins DA, Amour JA: Localization of sympathetic postganglionic and parasympathetic preganglionic neurons which innervate different regions of the dog heart. *J Comp Neurol* 229: 186-198 (1984).

Hoppeler H, Lindstedt SL, Claasen H, Taylor CR, Mathieu O, Weibel ER: Scaling mitochondrial volume in heart to body mass. *Respir Physiol* 55: 131-137 (1984).

Hwang LC, Tsai CH, Chen TH: Overweight and obesity-related metabolic disorders in hospital employees. *J Formos Med Assoc* 105: 56-63 (2006).

Ieda M, Fukuda K: New aspects for the treatment of cardiac diseases based on the diversity of functional controls on cardiac muscles: the regulatory mechanisms of cardiac innervation and their critical roles in cardiac performance. *J Pharmacol Sci* 109: 348-353 (2009).

Iwadare T, Mori H, Ishiguro K, Takeishi M: Dimensional changes of tissues in the course of processing. *J Microsc* 136: 323-327 (1984).

Jamieson JD, Palade GE: Specific granules in atrial muscle cells. *J Cell Biol* 23: 151-172 (1964).

Johnson TJ: Glutaraldehyde fixation chemistry: oxygen-consuming reactions. *Eur J Cell Biol* 45: 160-169 (1987).

Jørgensen A-M B, Marnier L, Pakkenberg B: No change in total length of white matter fibers in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 157: 878-883 (2008).

Karnovsky MJ: A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 27: 137-138 (1965).

Kasukurthi R, Brenner MJ, Moore AM, Moradzadeh A, Ray WZ, Santosa KB, Mackinnon SE, Hunter DA: Transcardial perfusion versus immersion fixation for assessment of peripheral nerve regeneration. *J Neurosci Methods* 184: 303-309 (2009).

Kaur T, Zhang Z-F: Obesity, breast cancer and the role of adipocytokines. *Asian Pacific J Cancer Prev* 6: 547-552 (2005).

Kenchiah S, Evans JC, Levy D, Wilson PW, Benjamin EJ, Larson MG, Kannel MG, Vasan RS: Obesity and the risk of heart failure. *N Engl J Med* 347: 305-313 (2002).

Kiernan JA: Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What they are and what they do. *Microsc Today* 8: 1-12 (2000).

Kinoshita M, Takano H, Taenaka Y, Mori H, Takaichi S, Noda H, Tatsumi E, Yagura A, Sekii H, Akutsu T: Cardiac disuse atrophy during LVAD pumping. *ASAIO Trans* 34: 208-212 (1988).

- Kinoshita M, Takano H, Takaichi S, Taenaka Y, Nakatani T: Influence of prolonged ventricular assistance on myocardial histopathology in intact heart. *Ann Thorac Surg* 61: 640-645 (1996).
- Kiriazis H, Du XJ, Feng X, Hotchkin E, Marshall T, Finch S, Gao XM, Lambert G, Choate JK, Kaye DM: Preserved left ventricular structure and function in mice with cardiac sympathetic hyperinnervation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289: H1359-H1365 (2005).
- Kirkeby S, Moe D: Studies on the actions of glutaraldehyde, formaldehyde, and mixtures of glutaraldehyde and formaldehyde on tissue proteins. *Acta Histochem* 79: 115-121 (1986).
- Kohno M, Fukui T, Horio T, Yokokawa K, Yasunari K, Yoshiyama M, Kurihara N, Takeda T: Cardiac hypertrophy and brain natriuretic peptide in experimental hypertension. *Am J Physiol* 266: R451-R457 (1994).
- Kollai M, Bonyhay I, Jokkel G, Szonyi L: Cardiac vagal hyperactivity in adolescent anorexia nervosa. *Eur Heart J* 15: 1113-1118 (1994).
- Korecky B, Masika M: Use of a heterotopic isograft for pharmacological and toxicological studies. *Toxicol Pathol* 18: 541-546 (1990).
- Lacobellis G, Ribaldo MC, Leto G, Zappaterreno A, Vecci E, Di Mario U, Leonetti F: Influence of excess fat on cardiac morphology and function: study in uncomplicated obesity. *Obes Res* 10: 767-773 (2002).
- Lamé MW, Jones DA, Wilson DW, Dunston SK, Segal HJ: Protein targets of monoclonal antibody to pyrrole in pulmonary artery endothelial cells. *J Biol Chem* 275: 29091-29099 (2000).
- Lamounier-Zepter V, Look C, Alvarez J, Christ T, Ravens U, Schunck W-H, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR, Morano I: Adipocyte fatty acid-binding protein suppresses cardiomyocyte contraction. *Circ Res* 105: 326-334 (2009).
- Lauer MS, Anderson KM, Kannel WB, Levy D: The impact of obesity on left ventricular mass and geometry. The Framingham Heart Study. *JAMA* 266: 231-236 (1991).

- Leopoldo AS, Sugizaki MM, Lima-Leopoldo AP, Nascimento AF, Luvizotto RAM, de Campos DHS, Okoshi K, Pai-Silva MD, Padovani CR, Cicogna AC: Cardiac remodelling in a rat model of diet-induced obesity. *Can J Cardiol* 26: 423-429 (2010).
- Leyton RA, Sonnenblick EH: The ultrastructure of the failing heart. *Am J Med Sci* 285: 304-327 (1969).
- Li C, Yang S, Zhang W, Shi X, Wang Q, Nyengaard JR, Tang Y: Unbiased stereological quantification of unmyelinated fibers in the rat brain white matter. *Neurosci Lett* 437: 38-41 (2008).
- Liao Y, Qu XF, Liu L, Dong XM, Yin DC: Sympathetic nerve in rat with pressure overload left ventricular hypertrophy. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 89: 2412-2415 (2009).
- Liatis S, Tentolouris N, Katsilambros N: Cardiac autonomic nervous system activity in obesity. *Pediatr Endocrinol Rev* 1: 476-483 (2004).
- Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, Sugizaki MM, Bruno A, Nascimento AF, Luvizotto RA, Oliviera Júnior SA, Castardeli E, Padovani CR, Cicogna AC: Myocardial dysfunction and abnormalities in intracellular calcium handling in obese rats. *Arg Bras Cardiol pii: S0066-78X2011005000061 Epub* (2011).
- Listenberger LL und Schaffer JE: Mechanisms of Lipoapoptosis: Implications for human heart disease. *Trends Cardiovasc Med* 12: 134-138 (2002).
- Look C, Morano I, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR, Lamounier-Zepter: Adipocyte-derived factors suppress heart contraction. *Int J Obes (Lond)* 35: 84-90 (2011).
- Mackintosh RM, Hirsch J: The effects of leptin administration in non-obese human subjects. *Obes Res* 9: 462-469 (2001).
- Magliano DJ, Shaw JE, Zimmet PZ: How to define the metabolic syndrome. *Ann Med* 38: 34-41 (2006).
- Mall G, Zimmer G, Baden S, Mattfeldt T: Capillary neoformation in the rat heart – stereological studies on papillary muscles in hypertrophy and physiologic growth. *Basic Res Cardiol* 85: 531-540 (1990).

- Marino TA, Houser SR, Martin FG, Freeman AR: An ultrastructural morphometric study of the papillary muscle of the right ventricle of the cat. *Cell Tissue Res* 230: 543-552 (1983).
- Marner L, Pakkenberg B: Total length of nerve fibers in prefrontal and global white matter of chronic schizophrenics. *J Psychiatr Res* 37: 539-547 (2003).
- Martignoni ME, Kunze P, Friess H: Cancer cachexia. *Mol Cancer* 2: 36 (2003).
- Mattfeldt T, Mall G: Estimation of length and surface of anisotropic capillaries. *J Microsc* 135: 181-190 (1984).
- Mattfeldt T, Möbius HJ, Mall G: Orthogonal triplet probes: an efficient method for unbiased estimation of length and surface of objects with unknown orientation in space. *J Microsc* 139: 279-289 (1985).
- Mattfeldt T, Drautz M, Mall G: Experimentelle Herzhypertrophie durch Thyroxingabe. *Pathologie* 10: 206-211 (1989).
- Mattfeldt T, Mall G, Gharehbaghi H, Möller P: Estimation of surface area and length with the orientator. *J Microsc* 159: 301-317 (1990).
- Maunsbach MB: The influence of different fixatives and fixation methods on the ultrastructure of rat kidney proximal tubule cells. *J Ultrastruct Res* 15: 283-309 (1966).
- Mayhew TM: The New stereological methods for interpreting functional morphology from slices of cells and organs. *Exp Physiol* 76: 639-65 (1991).
- Mayhew TM: Taking Tissue Samples from the Placenta: An illustration of principles and strategies. *Placenta* 29: 1-14 (2008).
- McDowell EM, Trump BF: Histologic fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. *Arch Pathol Lab Med* 100: 405-414 (1976).
- McGreevy, Thomson PC, Pride C, Fawcett A, Grassi T, Jones B: Prevalence of obesity in dogs examined by Australian veterinary practices and the risk factors involved. *Vet Rec* 156: 695-702 (2005).
- McNutt NS, Fawcett DW: The ultrastructure of the cat myocardium. II. Atrium muscle. *J Cell Biol* 42: 46-67 (1969).

- Mendez J, Keys A: Density and composition of mammalian muscle. *Metabolism* 9: 184-188 (1961).
- Mercadier JJ, Lompré AM, Wisnewsky C, Samuel JL, Bercovici J, Swynghedauw B, Schwartz K: Myosin isoenzym changes in several models of rat cardiac hypertrophy. *Circ Res* 49: 525-532 (1981).
- Messerli FH, Nunez BD, Ventura HO, Synder DW: Overweight and sudden death. Increased ventricular ectopy in cardiomyopathy of obesity. *Arch Intern Med* 147: 1725-1728 (1987).
- Missliwetz J, Ellinger A, Risser D: Sudden death caused by anorexia nervosa. *Beitr gerichtl Med* 49: 343-352 (1991).
- Momose M, Tyndale-Hines L, Bengel FM, Schwaiger M: How heterogenous is the cardiac autonomic innervation? *Basic Res Cardiol* 96: 539-546 (2001).
- Mühlfeld C, Rothen-Rutishauser B, Vabhecke D, Blank F, Gehr P, Ochs M: Visualization and quantitative analysis of nanoparticles in the respiratory tract by transmission electron microscopy. *Part Fibre Toxicol* 4: 11 (2007).
- Mühlfeld C, Nyengaard JR, Mayhew TM: A review of state-of-the art stereology for better quantitative 3D morphology in cardiac research. *Cardiovasc Pathol* 19: 65-82 (2010a).
- Mühlfeld C, Papadakis T, Krasteva G, Nyengaard JR, Hahn U, Kummer W: An unbiased stereological method for efficiently quantifying the innervation of the heart and other organs based on total length estimations. *J Appl Physiol* 108: 1402-1409 (2010b).
- Mühlfeld C, Das SK, Heinzl FR, Schmidt A, Post H, Schauer S, Papadakis T, Kummer W, Hoefler G: Cancer induces cardiomyocyte remodeling and hypoinnervation in the left ventricle of the mouse heart. *PLoS One* 6: e20424 Epub (2011).
- Murialdo G, Casu M, Falchero M, Brugnolo A, Patrone V, Cerro PF, Ameri P, Andraghetti G, Briatore L, Copello F, Cordera R, Rodriguez G, Ferro AM: Alterations in the autonomic control of heart rate variability in patients with anorexia or bulimia nervosa: correlations between sympathovagal activity, clinic features, and leptin levels. *J Endocrinol Invest* 30: 356-362 (2007).

Nascimento AF, Sugizaki MM, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Luvizotto RAM, Nogueira CR, Cicogna AC: A hypercaloric pellet-diet cycle induces obesity and comorbidities in wistar rats. *Arq Bras Endocrinol Metab* 52: 968-974 (2008).

Nascimento AF, Luvizotto RAM, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Seiva FR, Justulin Jr. LA, Silva MDP, Okoshi K, Wang XD, Cicogna AC: Long-term high-fat diet-induced obesity decreases the cardiac leptin receptor without apparent lipotoxicity. *Life Sciences* 88: 1031-1038 (2011).

Nielsen KK, Andersen CB, Kromann-Andersen B, Nordling J: Length density and total length of acetylcholinesterase positive nerves related to cystometry and in vitro studies of muscle strips in mini-pig urinary bladder after chronic outflow obstruction and recovery from obstruction. *Neurourol Urodyn* 14: 379-395 (1995).

Norris JE, Lippincott D, Wurster RD: Responses of canine endocardium to stimulation of the upper thoracic roots. *Am J Physiol* 233: H655-H659 (1977).

Nyengaard JR, Gundersen HJG: The isector: a simple and direct method for generating isotropic, uniform random sections from small specimens. *J Microsc* 165: 427-431 (1992).

Ochs M: A brief update on lung stereology. *J Microsc* 222: 188-200 (2006).

Ogata T, Yamasali Y: High-resolution scanning electron microscopic studies on the three-dimensional structure of the transverse-axial tubular system, sarcoplasmic reticulum and intercalated disc of the rat myocardium. *Anat Rec* 228: 277-287 (1990).

Ogawa Y, Nakao K, Mukoyama M, Hosoda K, Shirakami G, Arai H, Saito Y, Suga S, Jougasaki M, Imura H: Natriuretic peptides as cardiac hormones in normotensive and spontaneously hypertensive rats. The ventricle is a major site of synthesis and secretion of brain natriuretic peptide. *Circ Res* 69: 491-500 (1991).

Okere IC, Chess DJ, McElfresh TA, Johnson J, Rennison J, Ernsberger P, Hoit BD, Chandler MP, Stanley WC: High-fat diet prevents cardiac hypertrophy and improves contractile function in the hypertensive Dahl salt-sensitive rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 32: 825-31 (2005).

Okoshi MP, Okoshi K, Pai VD, Pai-Silva MD, Matsubara LS, Cicogna AC. Mechanical, biochemical, and morphological changes in the heart from chronic food-restricted rats. *Can J Physiol Pharmacol* 79: 754-760 (2001).

Okoshi K, Matsubara LS, Okoshi MP, Cicogna AC, Fioretto JR, Padovani CR, Aragon FF, Matsubara BB: Food restriction-induced myocardial dysfunction demonstrated by the combination of in vivo and in vitro studies. *Nutr Res* 22: 1353-1364 (2002).

Oron U, Mandelberg M: Comparative morphometry of the mitochondria and activity of enzymes in the myocardium of small mammals. *J Mol Cell Cardiol* 17: 627-632 (1985).

Oumi M, Yamamoto T: Ultrastructural changes in myocardial cells of rats fed a low protein diet. *Virchows Arch* 434: 159-165 (1999).

Ouwens DM, Boer C, Fodor M, De Galan P, Heine RJ, Maassen JA, et al. Cardiac dysfunction induced by high-fat diet is associated with altered myocardial insulin signalling in rats. *Diabetologia*. 48:1229-37 (2005).

Ouwens DM, Sell H, Greulich S, Eckel J: The role of epicardial and perivascular adipose tissue in the pathophysiology of cardiovascular disease. *J Cell Mol Med* 14: 2223-2234 (2010).

Perhonen MA, Franco F, Lane LD, Bucky JC, Blomquist CG, Zerwekh JE, Weatherall PT, Levine BD: Cardiac atrophy after bed rest and spaceflight. *J Appl Physiol* 91: 645-653 (2001).

Peterson LR, Waggoner AD, Schechtman KB, Meyer T, Gropler RJ, Barzilai B, Davila-Roman VG: Alterations in left ventricular structure and function in young healthy obese women: assessment by echocardiography and tissue Doppler imaging. *J Am Coll Cardiol* 43: 1399-1404 (2004).

Pissaia O, Rossi MA, Oliviera JS: The heart in protein-calorie malnutrition in rats: morphological, electrophysiological and biochemical changes. *J Nutr* 110: 2035-2044 (1980).

Platisa MM, Nestorovic Z, Damjanovic S, Gal V: Linear and non-linear heart rate variability measures in chronic and acute phase of anorexia nervosa. *Clin Physiol Funct Imaging* 26: 54-60 (2006).

- Plecha DM, Randall WC, Geis GS, Wurster RD: Localization of vagal preganglionic somata controlling sinoatrial and atrioventricular nodes. *Am J Physiol* 255: R703-R708 (1988).
- Poirier P, Martin J, Marceau P, Bitron S, Marceau S: Impact of bariatric surgery on cardiac structure, function and clinical manifestations in morbid obesity. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2: 193-201 (2004).
- Pow DV, Wright LL, Vaney DI: The immunocytochemical detection of amino-acid neurotransmitters in paraformaldehyde-fixed tissues. *J Neurosci Methods* 56: 115-123 (1995).
- Rakusan K, Heron MI, Kolar F, Korecky B: Transplantation-induced atrophy of normal and hypertrophic rat hearts: Effect on cardiac myocytes and capillaries. *J Moll Cell Cardiol* 29: 1045-1054 (1997).
- Rakusan K, Moravec J, Hatt PY: Regional capillary supply in the normal and hypertrophied rat heart. *Microvasc Res* 20: 319-326 (1980).
- Rechlin T, Weis M, Ott C, Bleichner F, Joraschky P: Alterations of autonomic cardiac control in anorexia nervosa. *Boil Psychiatry* 43: 358-363 (1998).
- Ren J: Leptin and hyperleptinemia – from friend to foe for cardiovascular function. *J Endocrinol* 181: 1-10 (2004).
- Ricci E, Smallwood S, Chouabe C, Mertani HC, Raccurt M, Morel G, Bonvallet R: Electrophysiological characterization of left ventricular myocytes from obese Sprague-Dawley rat. *Obesity (Silver Spring)* 14:778-7786 (2006).
- Rider OJ, Petersen SE, Francis JM, Ali MK, Hudsmith LE, Robinson MR, Clarke K, Neubauer S: Ventricular hypertrophy and cavity dilatation in relation to body mass index in women with uncomplicated obesity. *Heart* 97: 203-208 (2011).
- Rossi MA, Zucoloto S: Ultrastructural changes in nutritional cardiomyopathy of protein-calorie malnourished rats. *Br J Exp Pathol* 63: 242-253 (1982).
- Sargent PB: Double-label immunofluorescence with the laser scanning confocal microscope using cyanine dyes. *Neuroimage* 1: 288-295 (1994).

Scarlett JM, Donoghue S, Saidla J, Wills J: Overweight cats: prevalence and risk factors. *Int J Obes Relat Metab Disord* 18: S22-S28 (1994).

Schaper J, Meiser E, Stämmler G: Ultrastructural morphometric analysis of myocardium from dogs, rats, hamsters, mice, and from human hearts. *Circ Res* 56: 377-391 (1985).

Schaper J: Ultrastructural changes of the myocardium in regional ischemia and infarction. *Eur Heart J* 7: 3-9 (1986).

Schmiedl A, Schnabel PA, Mall G, Gebhard MM, Hunnemann DH, Richter J, Bretschneider HJ: The surface to volume ratio of mitochondria, a suitable parameter for evaluating mitochondrial swelling. Correlations during the course of myocardial global ischaemia. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 416: 305-315 (1990).

Schmiedl A, Schnabel PA, Richter J, Mall G, Bretschneider HJ: Preservation of cardiac myocytes subjected to different preconditions: a comparative morphometric study of beating, fibrillating, and cardioplegically arrested canine hearts. *Anat Rec* 235: 425-435 (1993).

Schocken DD, Holloway JD, Powers PS. Weight loss and the heart: Effects of anorexia nervosa and starvation. *Arch Intern Med* 149: 877-881 (1989).

Schümann HJ: What role do alpha- and beta-adrenoceptors play in the regulation of the heart? *Eur Heart J* 4 Suppl A: 55-60 (1983).

Sharma S, Adroque JV, Golfmann L, Uray I, Lemm J, Youker K, Noon GP, Frazier OH, Taegtmeier H: Intramyocardial lipid accumulation in the failing human heart resembles the lipotoxic rat heart. *FASEB J* 18: 1692-1700 (2004).

Sharma N, Okere IC, Duda MK, Chess DJ, O'shea KM, Stanley WC: Potential impact of carbohydrate and fat intake on pathological left ventricular hypertrophy. *Cardiovasc Res* 73: 257-68 (2007).

Silvani A, Bastianini S, Berteotti C, Franzini C, Lenzi P, Lo Martire V, Zoccoli G: Dysregulation of heart rhythm during sleep in leptin-deficient obese mice. *SLEEP* 33: 355-361 (2010).

Singer SJ, Nicolson GL: The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175: 720-731 (1972).

Singla P, Bardoloi A, Parkash AA: Metabolic effects of obesity: a review. *World J Diabets* 1: 76-88 (2010).

Sjöström M, Wretling ML, Karlberg I, Edén E, Lundholm K: Ultrastructural changes and enzyme activities for energy production in hearts concomitant with tumor-associated malnutrition. *J Surg Res* 42: 304-313 (1987).

Skepper JN: Immunocytochemical strategies for electron microscopy: choice or compromise. *J Microsc* 199: 1-36 (2000).

Smalcelj A, Puljević D, Buljević B, Brida V: Left ventricular hypertrophy in obese hypertensives: is it really eccentric? (An echocardiographic study). *Coll Antropol* 24: 167-183 (2000).

Smith HL, Willius FA: Adiposity of the heart: A clinical and pathological study of 136 obese patients. *Arch Intern Med* 52: 911-931 (1933).

Sommer JR, Jennings RB: Ultrastructure of cardiac muscle; in: *The heart and cardiovascular system*, Band 1, Kapitel 4; hrsg. v. Fozzard HA, Haber E, Jennings RB, Katz AM, Morgan HE. Scientific foundations, Raven Press, New York 1986, S.61-100.

Stereo DC: The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *Placenta* 3: 501-512 (1984).

Stirling JW: Immuno- and affinity probes for electron microscopy: a review of labelling and preparation techniques. *J Histochem Cytochem* 38: 145-157 (1990a).

Sugizaki MM, Carvalho RF, Aragon FF, Padovani CR, Okoshi K, Okoshi MP, Zanati SG, Pai-Silva MD, Novelli EL, Cicogna AC: Myocardial dysfunction induced by food restriction is related to morphological damage in normotensive middle-aged rats. *J Biomed Sci* 12: 641-649 (2005).

Sukura A, Soveri T, Lindberg LA: Morphometric quantitation of early autolytic changes in rat myocardial cells. *Res Vet Sci* 48: 276-279 (1990).

Tang Y, Nyengaard JR: A stereological method for estimating the total length and size of myelin fibers in human brain white matter. *J Neurosci Methods* 73: 193-200 (1997).

- Tanner JM, Kearns DT, Kim BJ, Sloan C, Jia Z, Yang T, Abel ED, Symons JD: Fasting-induced reductions in cardiovascular and metabolic variables occur sooner in obese versus lean mice. *Exp Biol Med* 235: 1489-1497 (2010).
- Tian M, Nishijima Y, Asp ML, Stout MB, Reiser PJ, Belury MA: Cardiac alterations in cancer-induced cachexia in mice. *Int J Oncol* 37: 347-353 (2010).
- Tomanek RJ: Sympathetic nerves modify mitochondrial and capillary growth in normotensive and hypertensive rats. *J Moll Cell Cardiol* 21: 755-764 (1989).
- Tomaselli GF, Marbán E: Electrophysiological remodelling in hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res* 42: 270-283 (1999).
- Tracy RE, Sander GE: Histologically measured cardiomyocyte hypertrophy correlates with body height as strongly as with body mass index. *Cardiol Res Pract* 2011: 658958 Epub (2011).
- Trivedi PS, Barouch LA: Cardiomyocyte apoptosis in animal models of obesity. *Curr Hypertens Rep* 10: 454-460 (2008).
- Tschöp M, Heiman ML: Rodent obesity models: An overview. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109: 307-319 (2001).
- Unger RH: The physiology of cellular liporegulation. *Annu Rev Physiol* 65: 333-347 (2003).
- Valensi P, Thi BN, Lormeau B, Pariès J, Attali JR: Cardiac autonomic function in obese patients. *Int J Obes Relat Metab Disord* 19: 113-118 (1995).
- Valensi P, Priès J, Lormeau B, Attia S, Attali J-R: Influence of nutrients on cardiac autonomic function in nondiabetic overweight subjects. *Metabolism* 54: 1290-1296 (2005).
- van der Laarse A, Vliegen HW, van der Nat KH, Hollaar L, Egas JM, Swier GP, van der Broek AJ: Comparison of myocardial changes between pressure induced hypertrophy and normal growth in the rat heart. *Cardiovasc Res* 23: 308-314 (1989).
- Vandewoude MF, Cortvrindt RG, Goovaerts MF, Van Paesschen MA, Buysens N: Malnutrition and the heart: a microscopic analysis. *Infusionstherapie* 15: 217-220 (1988).

- Vandewoude MF, Buysens N: Effect of aging and malnutrition on rat myocardium. I. The myocyte. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 421: 179-188 (1992a).
- Vandewoude MF, Buysens N: Effect of ageing and malnutrition on the rat myocardium. II. The microvasculature. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 421: 189-192 (1992b).
- Vandewoude MF: Morphometric changes in microvasculature during malnutrition. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 19: 376-380 (1995).
- Vaseghi M, Shivkumar K: The role of the autonomic nervous system in sudden cardiac death. *Prog Cardiovasc Dis* 50: 404-429 (2008).
- Watanabe H, Tanabe N, Watanabe T, Darbar D, Roden DM, Sasaki S, Aizawa Y: Metabolic syndrome and risk of development of atrial fibrillation: the Niigata preventive medicine study. *Circulation* 117: 1255-1260 (2008).
- Weibel ER: *Stereological methods. Practical methods for biological morphometry.* New York, Academic Press Vol. 1 (1979).
- Weibel ER, Hsia CCW, Ochs M: How much is there really? Why stereology is essential in lung morphometry. *J Appl Physiol* 102: 459-467 (2007).
- Wende AR, Abel ED: Lipotoxicity in the heart. *Biochim Biophys Acta* 1801: 311-319 (2010).
- West DB, York B: Dietary fat, genetic predisposition, and obesity: lessons from animal models. *Am J Clin Nutr* 67: 505S-512S (1998).
- Wilson CR, Tran MK, Salazar KL, Young ME, Taegtmeyer H: Western diet, but not high fat diet, causes derangements of fatty metabolism and contractile dysfunction in the heart of Wistar rats. *Biochem J* 406: 457-467 (2007).
- Wong CY, O'Moore-Sullivan T, Leano R, Byrne N, Beller E, Marwick TH: Alterations of left ventricular myocardial characteristics associated with obesity. *Circulation* 110: 1269-1275 (2004).

Wong CY, O'Moore-Sullivan T, Leano R, Hukins C, Jenkins C, Marwick TH: Association of subclinical right ventricular dysfunction with obesity. *J Am Coll Cardiol* 47: 611-616 (2006).

Young ME, Guthrie PH, Razeghi P, Leighton B, Abbasi S, Patil S, Youker KA, Taegtmeyer H: Impaired long-chain fatty acid oxidation and contractile dysfunction in the obese Zucker rat heart. *Diabetes* 51: 2587-2595 (2002).

Yuan BX, Ardell JL, Hopkins DA, Losier AM, Armour JA: Gross and microscopic anatomy of the canine intrinsic cardiac nervous system. *Anat Rec* 239(1): 75-87 (1994).

Zeidan A, Javadov S, Chakrabarti S, Karmazyn M: Leptin-induced cardiomyocyte hypertrophy involves selective caveolae and RhoA/ROCK-dependent p38 MAPK translocation to nuclei. *Cardiovasc Res* 77: 64-72 (2008).

Zhou YT, Grayburn P, Karim A, Shimabukuro M, Higa M, Baetens D, Orci L, Unger RH: Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. *Proc Natl Acad Sci* 92: 1784-1789 (2000).

Zick M, Rabl R, Reichert AS: Cristae formation-linking ultrastructure and function of mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1793: 5-19 (2009).

Internetquellen

food and agriculture organisation:

<http://www.fao.org/worldfoodsummit/english/fsheets/malnutrition.pdf>

Stand 24.02.2011

Statistisches Bundesamt Deutschland:

http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Presse/pm/2010/06/PD10__194__239,templateId=renderPrint.psml

Stand: 24.02.2011

7. Materialübersicht

7.1 Eingesetzte Substanzen

7.1.1 Chemikalien

Agarose	Biozym	Oldendorf, BRD
AZUR II	Merck KGaA	Darmstadt, BRD
Dimethoxypropan DMP	Merck KGaA	Darmstadt, BRD
DMP30 Beschleuniger	Fluka	Steinheim, BRD
Dinatriumcarbonat	Merck KGaA	Darmstadt, BRD
Dinatriumhydrogencarbonat	Merck KGa A	Darmstadt, BRD
Dinatriumtetraborat-10-hydrat Borax	Sigma	St. Louis, Missouri, USA
2-Dodecenylnbernsteinsäure-anhydrid	Merck KGaA	Darmstadt, BRD
DDSA		
Ethanol unvergällt	C. Roth GmbH & Co.	Karlsruhe, BRD
Epon	Fluka Chemie AG	Buchs, CH
Glucose	Merck KGaA	Darmstadt, BRD
Glutardialdehyd	Merck KGaA	Darmstadt, BRD
Glycerol	Merck KGaA	Darmstadt, BRD
Salzsäure HCL 1 N	Merck KGaA	Darmstadt, BRD
2(-4(2-Hydroxyethyl)1-piperazinyl) -ethansulfonsäure) Hepes	Boehringer GmbH	Mannheim, BRD
Kaliumchlorid	Merck KGaA	Darmstadt, BRD
Magnesiumchlorid-6-hydrat	Merck KGaA	Darmstadt, BRD
Methanol	J.T.Baker	Deventer, NL
Methylenblau	Schmidt & Co.	Untertürkheim, BRD
Methyl-Nadic Anhydrid MNA	Fluka	Steinheim, BRD
Natriumchlorid	C. Roth GmbH & Co.	Karlsruhe, BRD
Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA	Darmstadt, BRD

Natriumhydroxid	Merck KGaA	Darmstadt, BRD
Nickelammoniumsulfat	Fluka	Steinheim, BRD
Osmiumtetraoxid	Sigma	Steinheim, BRD
Paraffin	Merck KGaA	Darmstadt, BRD
Paraffinöl	Merck KGaA	Darmstadt, BRD
Paraformaldehyd	Merck KGaA	Darmstadt, BRD
Polyoxythylensorbitan Monolaurat (Tween 20)	Sigma-Aldrich GmbH & Co.	Steinheim, BRD,
Propylenoxid	C. Roth GmbH & Co.	Karlsruhe, BRD
Saccharose	C. Roth GmbH & Co.	Karlsruhe, BRD
Stickstoff flüssig	Linde	Unterschleißheim, BRD
Trismethoxymethylamino-methan Tris	C. Roth GmbH & Co	Karlsruhe, BRD
Triton X	Fluka	Steinheim, BRD
Uranylacetat	Merck KGaA	Darmstadt, BRD
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich GmbH & Co.	Steinheim, BRD
Xylol	Merck KGaA	Darmstadt, BRD
Zitonensäure	C. Roth GmbH & Co.	Karlsruhe, BRD

7.1.2 Seren

goat serum (normal) NGS	Dako	Glostrup, DK
bovine serum albumin BSA	Sigma-Aldrich GmbH GmbH & Co.	Steinheim, BRD
horse serum (normal)	Schlachthof Gießen	Gießen, BRD

7.1.3 Primäre Antikörper

rabbit- α -PGP (protein gene product) 9.5	Boitrend	Köln, BRD
sheep- α -Tyrosinhydroxylase	Chemicon Int.	Hofheim, BRD

7.1.4 Sekundäre Antikörper

swine-anti-rabbit Ig HRP 0,34 mg/ml	Dako	Glostrup, DK
donkey-anti-rabbit Ig Biotin 1,3 mg/ml	GE Healthcare Europe	Freiburg, BRD
Streptavidin FITC	Sigma-Aldrich GmbH & Co.	Steinheim, BRD
Donkey- α -sheep-Tyrosinhydroxylase 1,5 mg/ml	Dianova	Hamburg, BRD

7.1.5 Sonstige Substanzen

Tissue-Tek [®] (<11% Polyvinyl-Alkohol und <5% Carbowachs)	Sakure Finetek Europe B.V	Alphen aan den Rijn, NL
Entellan [®]	Merck KGaA	Darmstadt, BRD

6.2 Puffer und Lösungen

Phosphatpuffer 0,1 M, pH 7,4

Lösung A: 31,2 g Natriumdihydrogenphosphat in 1 l Aqua dest. (0,2 M)

Lösung B: 35,6 g Dinatriumhydrogenphosphat → in 1 l Aqua dest. (0,2 M)

Herstellung: 230 ml Lösung A
 +770 ml Lösung B
 pH-Wert 7,4 einstellen
 ad. 1000 ml Aqua dest.

Hepes-Ringer-Puffer, pH 7,4:

 7,79 g Natriumchlorid
 +0,418 g Kaliumchlorid
 +1,96 g Glucose
 +2,38 g Hepes
 +1,0 ml von 1 mM Magnesiumchlorid-6-hydratlösung
 +2,2 ml von 2,2 mM Kalziumchlorid-2-hydratlösung
ad. 1000 ml Aqua dest., pH-Wert 7,4 einstellen

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), pH 7,4:

Lösung A: 31,2 g Natriumdihydrogenphosphat in 1 l aqua dest. (0,2 M)

Lösung B: 35,6 g Dinatriumhydrogenphosphat in 1 l aqua dest. (0,2 M)

Ansatz: 28,75 ml Lösung A
 + 96,20 ml Lösung B
 + 22,4 g Natriumchlorid
ad. 5000 ml Aqua dest., pH-Wert 7,4 einstellen

Tris- HCL:

Lösung A: 121,14 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan in 1 l Aqua dest. auflösen

Lösung B: 1 N Salzsäure

Herstellung: 75 ml Lösung A
 + ca. 60 ml Lösung B (pH 7,4 einstellen)
ad. 1500 ml Aqua dest.

Zitronensäure 50 mM, pH 6,0:

Ansatz: 9,62 g Zitronensäure in 1 l Aqua bid. lösen
 + ca. 13 Natriumhydrogenplätzchen
 mit 2 M NaOH pH-Wert 6,0 einstellen

Zitronensäure 10 mM: 200 ml Zitronensäure 50 mM
 800 ml Aqua dest.

Carbonatgepuffertes Glycerol, pH 8,6:

Ansatz: 50 ml 0,5 M Natriumhydrogencarbonatlösung
 mit 0,5 M Dinatriumcarbonat pH-Wert 8,6 einstellen

Methylenblau-Färbelösung:

Ansatz: 1 g Methylenblau in 1 l Aqua dest. auflösen

Richardson-Blau-Färbelösung:

Ansatz: 0,5 g AZUR II
 +0,25 g Methylenblau

+0,25 Borax

ad. 100 ml Aqua dest., mindestens 4 Wochen Reifung, Filtration vor Gebrauch

Fixationslösung: 4 % Paraformaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer, pH-Wert 7,4:

Ansatz: 40 g Paraformaldehyd ad. 500 ml Aqua dest., auf 70 °C erhitzen
 + einige Tropfen 0,2 M NaOH dazu, bis Lösung wieder klar ist,
 erkalten lassen
 + 500 ml 0,2 M Phosphatpuffer

pH-Wert 7,4 einstellen und durch Membran (Porengröße 0,2 µm) filtrieren

1,5 % Paraformaldehydlösung mit 1,5 % Glutardialdehyd in Phosphatpuffer:

Herstellung: 15 g Paraformaldehyd ad. 500 ml Aqua dest., auf 70 °C erhitzen
 + einige Tropfen 0,2 M Natronlauge dazu, bis Lösung wieder klar ist,
 erkalten lassen
 + 500 ml 0,2 M Phosphatpuffer

pH-Wert 7,4 einstellen und durch Membran (Porengröße 0,2 µm) filtrieren

+ 60 ml Glutardialdehyd (25 %ig)

Histoblocklösung

10% Pferdeserum

0,5% TWEEN 20

0,1% Rinderserum (normal)

8. Anhang

Eigene Veröffentlichungen zum Thema

Gruber C, Nink N, Nikam S, Magdowski G, Kripp G, Voswinckel R, Mühlfeld C: Myocardial remodelling in left ventricular atrophy induced by caloric restriction. *J Anat* 220:179-185 (2012). Epub 2011 Nov 13.

Gruber C, Kohlstedt K, Loot AE, Fleming I, Kummer W, Mühlfeld C: Stereological characterization of left ventricular cardiomyocytes, capillaries and innervation in the non-diabetic, obese mouse. *Cardiovasc Path.* 2011 Dec 22. (Epub ahead of print)

Erklärung

gemäß § 10 (5) der Promotionsordnung der Justus-Liebig-Universität Gießen

Ich erkläre: „Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Carina Gruber

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Christian Mühlfeld ganz herzlich bedanken. Er hat mir freundlicherweise das Thema meiner Doktorarbeit zur Verfügung gestellt und mich bei der Planung und Durchführung meiner Untersuchungen und deren Auswertung stets sehr tatkräftig und motivierend unterstützt. Es war ihm immer ein großes Anliegen, mir die Praxis der guten wissenschaftlichen Arbeit zu vermitteln und er nahm sich stets Zeit, mir meine vielen Fragen ausführlich und geduldig zu beantworten. Seine Betreuung und Unterstützung waren von unschätzbarem Wert für mich.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Martin Bergmann für die Übernahme der Betreuung aus dem Fachbereich der Veterinärmedizin.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Kummer danke ich sehr für die Erlaubnis, die Laborarbeiten in seiner Abteilung durchführen zu dürfen, wo mir stets alle nötigen Materialien und Geräte zur Verfügung standen. Die freundliche Arbeitsatmosphäre und große Hilfsbereitschaft aller dort Arbeitenden habe ich sehr geschätzt.

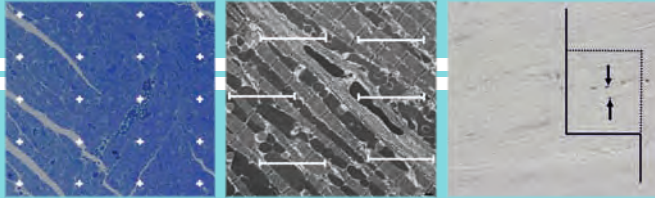
Ganz besonders herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Frau Tamara Papadakis für die überaus freundliche Betreuung meiner Labortätigkeiten, bei der sie mir jederzeit große Hilfestellung gab. Sie vermittelte mir stets sehr geduldig und sachkundig viele Laborweisheiten und hat dadurch enorm zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Herrn Gerd Magdowski und Herrn Gerhard Kripp möchte ich sehr herzlich für die großartige Hilfe und Unterstützung beim Anfertigen der Schnitte für die Elektronenmikroskopie danken. Aufgrund der guten und sachkundigen Einarbeitung von Herrn Magdowski hat mir die Arbeit am Elektronenmikroskop große Freude bereitet.

Frau Nadine Nink danke ich für die Assistenz bei der Erhebung einiger Daten bezüglich der Mäuse mit Untergewicht.

Frau Karola Michael möchte ich ebenfalls ganz besonders danken. Sie hat mir durch ihre große Sachkundigkeit bei der Bearbeitung meiner Bilder und Graphiken sehr geholfen und so zu einer rechtzeitigen Fertigstellung meiner Arbeit beigetragen.

An dieser Stelle danke ich auch ganz herzlich meinen Eltern, meiner Schwester und meinem Mann für ihre bedingungslose Unterstützung während meines Studiums und meiner Doktorarbeit.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5900-2



9 783835 959002