

Diplomarbeit

Spermidin und kardiales Remodeling nach erhöhter Drucklast

**Spermidine and cardiac remodeling in response to pressure-
induced overload**

eingereicht von

Corinna Simonini

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktorin der gesamten Heilkunde
(Dr. med. univ.)**

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Abteilung für Kardiologie

unter der Anleitung von

Ass. Prof. PD Dr. Simon Sedej

Graz, 15. Juli 2014

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 15. Juli 2014

Corinna Simonini

Danksagungen

Ich möchte diese Arbeit ganz besonders meinen Eltern Silvana, Gerhard und Norbert, sowie meiner Großmutter Karoline widmen. Ihr habt mich auf meinem bisherigen Lebensweg bedingungslos unterstützt und mir die Verwirklichung zahlreicher Ideen und Träume ermöglicht.

I want to thank Charles for being the source of quite some of those ideas and dreams.

Mein tiefster Dank und meine unendliche Wertschätzung gebühren meinem Betreuer, Simon Sedej, der mir durch seine Worte und Taten immer das Gefühl gab, einen Ansprechpartner zu haben und der mir oftmals dabei half, den roten Faden in meinen Gedanken wiederzufinden.

Ich hätte mir keinen besseren Betreuer wünschen können.

Zusammenfassung

Bluthochdruck ist der häufigste kardiovaskuläre Risikofaktor für die Entstehung einer Herzinsuffizienz. Erhöhter Blutdruck steht in Zusammenhang mit einem strukturellen und funktionellen Umbau des Myokards, darunter Hypertrophie, erhöhte interstitielle Fibrose und eine Rarifizierung der Mikrozirkulation, mit folgender permanenter Herzschiädigung. Natürliche kardioprotektive Wirkstoffe mit Wirkung auf die zellulären Vorgänge, die der Entstehung von hypertensiven kardiovaskulären Ereignissen (wie Hypertrophie oder Herzinsuffizienz) zugrunde liegen, sind rar oder haben problematische Nebenwirkungen. Spermidin ist ein natürliches Polyamin und ein potenter Stimulator von Autophagie, einem zytoprotektiven Vorgang zur Aufrechterhaltung der strukturellen und funktionellen Homöostase von Kardiomyozyten. Jedoch ist unklar ob eine orale Nahrungsergänzung mit Spermidin das kardiale Remodeling unter Drucküberlast reduziert.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Auswirkungen einer oralen Spermidingabe auf das Ausmaß von Fibrose und Hypertrophie in Mäuseherzen nach erhöhter Drucklast (durch Aortenkonstriktion) zu beschreiben.

C57BL/6 Mäusen wurde Trinkwasser ohne (= Kontrolle) und mit Spermidin (3 mmol/L) verabreicht und die Mäuse einer Sham bzw. TAC-Operation unterzogen. Die Herzen wurden 3 und 6 Wochen nach der Operation gewogen und untersucht. Die histologische Analyse wurde an in Paraffin eingebetteten Herzschnitten durchgeführt. Dazu wurden die Herzschnitte mit Pikrosirius Rot, bzw. Wheat-Germ-Agglutinin gefärbt um das Ausmaß des Kollagengehalts und die Querschnittsfläche der Kardiomyozyten zu messen. Bei Sham-Mäusen wurden zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede hinsichtlich Fibrose und Hypertrophie zwischen spermidinbehandelten Mäusen und Kontrollmäusen gefunden. 3 Wochen nach TAC zeigten spermidinbehandelte Mäuse ein reduziertes Herzgewicht/Tibialänge-Verhältnis, jedoch keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Kardiomyozytengröße. 6 Wochen nach TAC zeigten spermidinbehandelte Mäuse ein geringeres Herzgewicht/Tibialänge-Verhältnis, welches mit weniger Hypertrophie der Kardiomyozyten assoziiert war. Spermidinbehandelte Herzen zeigten 3 sowie 6 Wochen nach TAC weniger Fibrose, jedoch zeigten diese Unterschiede keine statistische Signifikanz.

Unsere Ergebnisse demonstrieren somit einen milden protektiven Effekt einer Nahrungsergänzung mit Spermidin auf das kardiale Remodeling in Wildtyp-Mäuseherzen unter erhöhter Drucklast.

Abstract

Hypertension is the most prevalent cardiovascular risk factor for the development of heart failure (HF). Increased blood pressure is associated with structural and functional myocardial remodeling including hypertrophy, increased interstitial fibrosis and the rarefaction of the microcirculation and leads to a permanent damage of the heart. Natural cardioprotective agents that target the cellular processes underlying the development of hypertension-associated cardiovascular manifestations, such as hypertrophy and HF, remain rare or have problematic off-target effects. Spermidine is a natural polyamine and a potent inducer of autophagy, a cytoprotective process that maintains structural and functional cardiomyocyte homeostasis. However, it remains unknown whether oral spermidine supplementation reduces cardiac remodeling under pressure-induced overload.

The aim of this study was to characterize the effects of oral spermidine supplementation on the extent of fibrosis and hypertrophy in response to pressure overload induced by transverse aortic constriction (TAC).

Wild-type C57BL/6 (WT) mice received drinking water without (control) or with spermidine (3 mmol/L) and underwent Sham or TAC surgery. Hearts were weighed and examined 3 and 6 weeks after surgery. Histological analysis was performed on paraffin-embedded cardiac tissue sections stained with picrosirius red and wheat-germ-agglutinin to assess the collagen content and the cross sectional area of cardiomyocytes (as measure for hypertrophy), respectively.

At baseline (Sham), we found no significant changes in fibrosis and hypertrophy at any time point between control and spermidine-treated hearts. After 3 weeks TAC, however, spermidine-treated mice showed reduced heart weight-to-tibia length ratio, but no significant change in the cross sectional area of cardiomyocytes. After 6 weeks TAC, reduced heart weight-to-tibia length ratio was associated with reduced hypertrophy of cardiomyocytes. Spermidine-treated hearts showed less fibrosis compared to control hearts 3 and 6 weeks after TAC, but these differences did not reach statistical significance.

Our results show a mild protective effect of spermidine supplementation on cardiac remodeling in WT mouse hearts in response to pressure-induced overload.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Pathophysiologie der Herzinsuffizienz	1
1.1.1	Kardiales Remodeling	1
1.1.2	Hypertrophie	2
1.1.3	Fibrose	4
1.1.4	Vaskuläres Remodeling	5
1.1.5	Zelltod	6
1.2	Autophagie – ein körpereigener Recyclingmechanismus	7
1.2.1	Grundlegendes	7
1.2.2	Autophagie im Herzen unter Normbedingungen	9
1.2.3	Autophagie im Herzen bei chronischer Druckbelastung	9
1.3	Spermidin – Ein Stimulator der Autophagie	11
1.3.1	Polyaminbiosynthese	11
1.3.2	Wirkungsweise von Spermidin	12
1.3.3	Autophagie-unabhängige Effekte von Spermidin	13
2	Hypothese	14
3	Material und Methoden	15
3.1	Mäuse und Spermidingabe	15
3.2	Transversale Aortenkonstriktion	16
3.3	Versuchsgruppen	17
3.4	Schnittherstellung	18
3.5	Färbungen	18
3.5.1	Pikrosiriusrot-Färbung (Kollagenanteil)	18
3.5.2	Fluoreszenzfärbung (Extrazelluläre Matrix)	18
3.6	Bilddarstellung und Bildaufnahme	20
3.6.1	Aperio Scanner	20

3.6.2	Fluoreszenzmikroskop.....	20
3.7	Analytische Methoden	20
3.7.1	Analyse des Kollagengehalts.....	20
3.7.2	Analyse der Kardiomyozytengröße	22
3.8	Statistische Analyse	24
4	Ergebnisse	25
4.1	Gravimetrie	25
4.2	Histologische Analyse	27
4.2.1	Querschnittsfläche der Kardiomyozyten	27
4.2.2	Kollagenanalyse.....	29
5	Diskussion.....	32
6	Literaturverzeichnis.....	37
7	Lebenslauf.....	46

Glossar und Abkürzungen

ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym
AdoMet	S-Adenosyl-L-Methionin
AdoMetDC	S-Adenosylmethionin Decarboxylase
ANOVA	Varianzanalyse
Ao	Aorta
AT-I	Angiotensin-I
AT-II	Angiotensin-II
Atg	Autophagie-assoziiertes Gen
ATP	Adenosintriphosphat
CGRP	Calcitonin Gene-Related Peptide (Engl.)
CSA	Querschnittsfläche (Engl. Cross-sectional area)
DcAdoMet	Decarboxyliertes S-Adenosyl-L-Methionin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EF	Auswurfsfraktion (Engl. Ejection fraction)
ER	Endoplasmatisches Reticulum
EZM	extrazelluläre Matrix
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
HG	Herzgewicht
IL-6	Interleukin-6
I/R	Ischämie/Reperfusion
IVS	Intraventrikuläres Septum
Lcca	Linke <i>Arteria Carotis Communis</i>
LV	Linker Ventrikel
LVEDD	linksventrikulärer end-diastolischer Durchmesser
M/V	Masse/Volumen
MAT	Methionin Adenosyltransferase
MMP	Matrix-Metalloprotease
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
MW	Mittelwert
NO	Stickstoffmonoxid (Engl. Nitric Oxide)

NOS	NO Synthase
ODC	Ornithin-Decarboxylase
PAO	Polyaminoxidase
PBS	Phosphate Buffered Saline (Engl.)
PSR	Pikrosirius-Rot Färbung
PW	Hinterwand (Engl. Posterior Wall)
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (Engl. Reactive Oxygen Species)
SD	Standardabweichung (Engl. Standard Deviation)
SE	Standardfehler (Engl. Standard Error)
SMO	Sperminoxidase
Spd	Spermidin
SSAT	Spermidine/Spermine-N(1)-Acetyltransferase
TAC	Transversale Aortenkonstriktion
TGF- β	Transforming growth factor- β (Engl.)
TIF	Tagged Image File (Engl.)
TL	Tibialänge
WGA	Wheat-Germ-Agglutinin (Engl.)
WT	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die verschiedenen Formen der Ventrikelgeometrie bei Hypertrophie.

Links unten: die normale Ventrikelform unter physiologischen Bedingungen (normale Ventrikelmasse und relative Wanddicke); links oben: konzentrisches Remodeling (normale Ventrikelmasse, erhöhte relative Wandstärke); rechts oben: konzentrische Hypertrophie (erhöhte Ventrikelmasse bei erhöhter relativer Wandstärke); rechts unten: exzentrische Hypertrophie (erhöhte Ventrikelmasse bei normaler relativer Wandstärke). Abgeändert nach Vorlage von (Rodriguez et al. 2010). 3

Abbildung 2: Formen des Zelltods. Bei der Apoptose (programmierter Zelltod) kommt es

zum Schrumpfen der Zelle und einer Fragmentierung des Zellkerns. Die Nekrose geht mit einer Zellschwellung einher, gefolgt von einer Ruptur der Plasmamembran und Freisetzen der Zytoplasmabestandteile. Der Autophagie-assoziierte Tod stellt eine komplizierte Sonderform dar, mit oft vorausgehendem Versuch der Zelle, einer Erschöpfung der Energiereserven entgegenzuwirken. Abgeänderter nach Vorlage von (Hotchkiss *et al.* 2009).

..... 6

Abbildung 3: Mechanismus der Autophagie. Eine Isolationsmembran (Phagophore)

umschließt Portionen von Zytoplasma und bildet das von einer Doppelmembran umgebene Autophagosom. Durch Andockung an ein Lysosom kommt es zur Bildung des Autophagolysosoms und zum Abbau der Zytoplasmabestandteile. Dieser Vorgang kann der Zelle u.a. zur Bereitstellung von Energie dienen. Abgeändert nach Vorlage von (Meléndez & Levine 2005).....8

Abbildung 4: Biogene Amine. Oben angeführt sind die Strukturformeln der natürlich

vorkommenden Polyamine: Putrescin, Spermidin und Spermin. Abgeändert nach Vorlage von (Minois, Carmona-Gutierrez & Madeo, 2011). 11

Abbildung 5: Polyamin-Stoffwechsel. In grün: Polyamin-Biosynthese, ausgehend von den

Aminosäuren Methionin und Arginin; in blau: Polyamin-Abbau; in rot: hemmendes Protein; Polyamine können untereinander interkonvertiert werden: Spermidin entsteht als Zwischenprodukt bei der Bildung von Spermin aus Putrescin. Abgeändert nach Vorlage von (Minois, Carmona-Gutierrez & Madeo 2011). 12

Abbildung 6: Hypothese. Spermidinbehandelte und Kontroll- (keine Spermidinabgabe)

Wildtyp-Mäuse wurden TAC unterzogen um die Drucklast zu erhöhen. Chronische Drucküberlast führt zum kardialen Remodeling, gekennzeichnet/charakterisiert durch

Hypertrophie und vermehrte Fibrose. Wir haben die Auswirkungen einer Spermidinbehandlung anhand der Analyse von eventuellen Veränderungen der Parameter Fibrose und Hypertrophie getestet. Ein langsames Fortschreiten der pathologischen Veränderungen könnte auf kardioprotektive Effekte von Spermidin und einen verlangsamten Übergang zur dekompensierten Herzinsuffizienz hinweisen. Gesteigerte/erhöhte Autophagierate und/oder erhöhte NO-Bioverfügbarkeit im Herzen werden als potenzielle Mechanismen für Spermidineffekte verantwortlich gemacht. HI = Herzinsuffizienz; Spd = Spermidin; NO = Stickstoffmonoxid; Abgeändert nach Vorlage von (Anand 2008) & (Nishida et al. 2009).....14

Abbildung 7: Experimenteller Plan......15

Abbildung 8: Transversale Aortenkonstriktion (TAC). Links: Die Aortenkonstriktion wurde mithilfe eines Fadens (s) durchgeführt. Dieser wurde auf Höhe der thorakalen Aorta (Ao), zwischen dem Ursprung des *Truncus brachiocephalicus* (ria) und der linken *Arteria carotis communis* (lcca) angelegt und verknotet. (LV: linker Ventrikel); Rechts: Vor und nach erfolgter TAC. Eine 27-Gauge Nadel (Abstandhalter) wurde verwendet um das Ausmaß der Aortenkonstriktion zu standardisieren. Abgeändert nach Vorlage von (Yamada et al., 2006). 16

Abbildung 9: Kollagenanalyse mittels Image J. (a) Originalbild der PSR-Färbung vor der Analyse. Eine Duplikatur (b) wurde hinsichtlich ihres Kontrastes verändert und das kollagene (kontrastreichere) Gewebe (↗) rot angefärbt bis es in etwa dem Ausmaß an Kollagen in dem Originalbild (a) entsprach. Anschließend wurde das gesamte Herzgewebe mit Ausnahme von Ventrikelvolumen und größerer Gefäßlumina (*) angefärbt. (d) Setzen der individuellen Schwelle für das Ausmaß der Rotfärbung in den Bildern. (e) Ergebnisse vom Kollagenanteil (Bild b) und Herzschnittanteil (Bild c) im Vergleich zur gesamten Bildfläche. 22

Abbildung 10: Analyse der Kardiomyozytengröße. (a) Originalaufnahme von einem mit WGA gefärbten Herzschnitt unter dem Fluoreszenzmikroskop. In schwarz sind die einzelnen Kardiomyozyten zu sehen, umgeben von extrazellulärer Matrix, hier grün. (b) und (c) zeigen die Analyse der CSA in Image J. Mittels Makro wurden die Kardiomyozyten einzeln erfasst und nummeriert. Nicht vollständig auf dem Bild abgebildete Zellen wurden aus der Analyse ausgeschlossen. (d) zeigt einen Ausschnitt aus der Liste von Ergebnissen, die zu jedem Herzschnitt geliefert wurde. Sämtliche Zellen, die von dem Makro erfasst wurden, sind mit ihrer jeweiligen Größe angegeben.....23

Abbildung 11: Analyse des Herzgewicht-Tibiallänge-Verhältnisses. Die Balken zeigen Mittelwerte mit Standardfehler. Kontrolle = ohne Spermidin. * $P < 0.05$ versus Sham Gruppe OHNE Spermidin; # $P < 0.05$ versus Sham Gruppe MIT Spermidin; ° $P < 0.05$ versus jeweilige Kontrollgruppe; & $P < 0.05$ versus TAC 3 Wochen MIT Spermidin; in den Balken ist die jeweilige Anzahl der Versuchstiere in der entsprechenden Versuchsgruppe angegeben.....26

Abbildung 12: WGA-Färbung. Typische Beispiele der Aufnahmen von den mit WGA behandelten Herzschnitten (40-fache Vergrößerung). In grün ist die extrazelluläre Matrix dargestellt.. 28

Abbildung 13: Kardiomyozyten Querschnittsfläche. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte mit Standardfehler der jeweiligen Gruppen. Pro Herz (pro Versuchstier) wurden im Durchschnitt 900 bis 1500 Zellen analysiert. * $P < 0.05$ versus Sham-Gruppe OHNE Spermidin; # $P < 0.05$ versus Sham-Gruppe + Spermidin; § $P < 0.05$ versus TAC 3 Wochen OHNE Spermidin; Kontrolle = ohne Spermidinbehandlung; in den Balken ist die jeweilige Anzahl der Versuchstiere der entsprechenden Versuchsgruppe angegeben 29

Abbildung 14: Pikrosirius (PSR) Färbung. Ausschnitte aus mit PSR gefärbten Herzschnitten, die als Beispiele für den jeweiligen Durchschnittswert an Kollagen (hier in Rot) einer Versuchsgruppe dienen sollen.30

Abbildung 15: Mittelwerte und Häufigkeitsverteilungen des Kollagenanteils der jeweiligen Versuchsgruppen. Darstellung der Ergebnisse aus der Kollagenanalyse mittels Box-Plot-Diagramm. Die Striche in der Mitte stellen den Mittelwert der einzelnen Gruppen dar, die Boxgrenzen das 25-75%-Perzentil und die Querbalken oben und unten die jeweiligen Extremwerte. Ausreißer sind mittels (◆) dargestellt. * $P < 0.001$ versus Sham-Gruppe OHNE Spermidin; # $P < 0.001$ versus Sham-Gruppe + Spermidin; Weisse Boxen = ohne Spermidinbehandlung (Kontrolle), rote Boxen = spermidinbehandelte Mäuse. Unter den Boxen ist die jeweilige Anzahl der Versuchstiere in den entsprechenden Versuchsgruppen angegeben. 31

1 Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind weltweit nach wie vor die Haupttodesursache (1). Laut Statistik Austria starb im Jahr 2008 jeder dritte Österreicher und jede zweite Österreicherin aufgrund einer kardiovaskulären Erkrankung, Herzinsuffizienz betrifft derzeit mehr als 200.000 Menschen in Österreich mit steigender Tendenz (ca. 10.000 Neudiagnosen pro Jahr). Prognosen sehen einen weiteren Anstieg der Herzinsuffizienz-Fälle für die kommenden Jahre voraus, durch die erhöhte Lebenserwartung insbesondere bei älteren Patienten (Quelle: Statistik Austria). Die Sterblichkeit bei Herzinsuffizienz liegt mit über 50 % innerhalb von 5 Jahren nach der Diagnose höher als bei vielen Krebserkrankungen (2).

1.1 Pathophysiologie der Herzinsuffizienz

Herzinsuffizienz kann als Folge von strukturellen sowie funktionellen Herzerkrankungen auftreten. Diese Erkrankungen können sowohl das Perikard, Myokard, Endokard oder auch große Gefäße betreffen, wobei die Mehrheit der Patienten eine Dysfunktion des linksventrikulären Myokards aufweist (3). Dabei kann es sich um eine Störung der ventrikulären Füllung oder der ventrikulären Auswurfleistung handeln. Die Beschwerden der Patienten umfassen häufig zunächst sehr allgemeine Symptome wie Belastungseinschränkung („Leistungsknick“), Abgeschlagenheit und Müdigkeit, aber auch Luftnot, Schwellungen der Beine und Herzrhythmusstörungen (4). Bisher ist die einzige Heilungsmöglichkeit bei fortgeschrittener Herzinsuffizienz die Herztransplantation. Eine bessere Früherkennung, neue, effektivere Therapien aber vor allem auch präventive Maßnahmen durch z. B. gesündere Ernährung erfordern ein tiefergehendes Verständnis der zellulären Mechanismen, die zur Herzinsuffizienz führen.

1.1.1 Kardiales Remodeling

Strukturelle und funktionelle Veränderungen im Myokard können verschiedene Auslöser haben. Zu jenen gehören unter anderem ein Myokardinfarkt, eine koronare Herzkrankheit (KHK), eine entzündliche Herzmuskelerkrankung (Myokarditis), eine erhöhte Volumenbelastung des Herzens, oder eine chronisch erhöhte Drucklast (5). Als Hauptverursacher der Drucklasterhöhung sind überwiegend ein chronisch erhöhter

arterieller Blutdruck (6,7), aber auch andere Ursachen wie z.B. eine Aortenklappenstenose, zu nennen, die zu einer erhöhten Beanspruchung des Myokards führen (8,9). Um den systolischen Wandstress und den gesteigerten Sauerstoffbedarf, die aus der erhöhten Nachlast resultieren, zu reduzieren, reagiert das ventrikuläre Myokard mit einer Verdickung auf dem Boden einer **Hypertrophie** der Kardiomyozyten. Die strukturellen Veränderungen im „gestressten“ Myokard umfassen jedoch nicht nur die Hypertrophie der Kardiomyozyten sondern eine Reihe von weiteren Veränderungen, allesamt zusammengefasst unter dem Begriff „**Remodeling**“. So kommt es des Weiteren zu strukturellen Veränderungen der Mikrozirkulation im Myokard (10), der Extrazellulären Matrix (EZM) (11–13), sowie zu einem Zelltod der Herzmuskelzellen (14), die durch von Fibroblasten produziertem Bindegewebe ersetzt werden (**Fibrose**) (15,16). Jenen Umbauprozessen vorausgehend ist die Reaktivierung eines embryonalen Genprogrammes, welches diese adaptiven bzw. maladaptiven Veränderungen steuert (17). In den folgenden Absätzen wird auf die wichtigsten Aspekte des kardialen Remodelings näher eingegangen.

1.1.2 Hypertrophie

Hypertrophie ist eine Größenzunahme der einzelnen Muskelzellen und ist der entscheidende Kompensationsmechanismus des Herzens bei vermehrter (bio-)mechanischer Belastung. Auf zellulärer Ebene erfolgt Hypertrophie durch einer Steigerung der Proteinsynthese und einer vermehrten Organisation der Sarkomere (18).

Die Geometrie des linken Ventrikels kann dabei vier verschiedene Formen annehmen (siehe Abbildung 1), die anhand der linksventrikulären Masse und der relativen Wandstärke (Verhältnis von Wanddicke zu Kammerdurchmesser) bestimmt werden: über 2/3 der betroffenen Patienten zeigen eine normale Ventrikelgeometrie (normale Ventrikelmasse und relative Wandstärke). Daneben gibt es das konzentrische Remodeling (normale Ventrikelmasse bei erhöhter relativer Wandstärke), eine exzentrische Hypertrophie (erhöhte Ventrikelmasse bei normaler relativer Wandstärke) und die konzentrische Hypertrophie (erhöhte Ventrikelmasse bei erhöhter relativer Wandstärke).

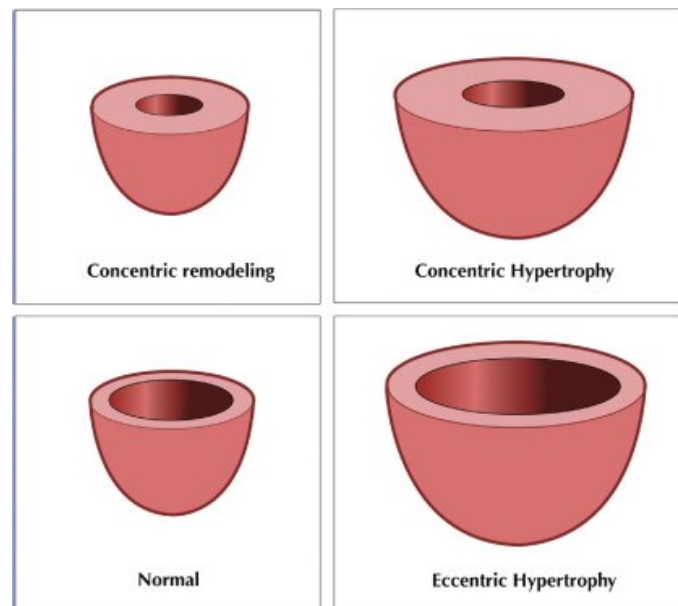


Abbildung 1: Die verschiedenen Formen der Ventrikelgeometrie bei Hypertrophie. Links unten: die normale Ventrikelform unter physiologischen Bedingungen (normale Ventrikelmasse und relative Wanddicke); links oben: konzentrisches Remodeling (normale Ventrikelmasse, erhöhte relative Wandstärke); rechts oben: konzentrische Hypertrophie (erhöhte Ventrikelmasse bei erhöhter relativer Wandstärke); rechts unten: exzentrische Hypertrophie (erhöhte Ventrikelmasse bei normaler relativer Wandstärke). Abgeändert nach Vorlage von (Rodriguez et al. 2010).

Die beste Prognose ist mit einer normalen Ventrikelgeometrie assoziiert, während eine konzentrische Hypertrophie in den überwiegenden Fällen mit einer schlechten Prognose einhergeht. Jedoch spielt nicht nur die Geometrie des Ventrikels alleine, sondern vor allem die linksventrikuläre Masse hier als beeinflussender Faktor eine wichtige Rolle (19). Wann das Herz welche Form der Adaptation annimmt, wird sowohl von der Volumenbelastung als auch von den kontraktilen Eigenschaften des Myokards abhängig (20).

Bislang ist man davon überzeugt, dass die durch Druckbelastung induzierte Hypertrophie der Herzmuskelzellen anfänglich ein bedeutender Kompensationsmechanismus ist. Jedoch kann dieser kompensierte Zustand bei anhaltender Belastung klinisch symptomatisch werden (durch eine systolische, diastolische oder kombinierte Dysfunktion) und sich zu einer manifesten Herzinsuffizienz entwickeln (21). Die systolische Herzinsuffizienz (gekennzeichnet durch eine verminderte Auswurfsleistung) ist im Regelfall mit einer exzentrischen Hypertrophie, die diastolische Herzinsuffizienz (charakterisiert durch eine eingeschränkte Ventrikelfüllung und normale Auswurfleistung) mit einer konzentrischen Hypertrophie vergesellschaftet (22). Die akute Dekompensation einer systolischen sowie

auch diastolischen Herzinsuffizienz ist durch einen Anstieg des diastolischen Drucks (23) sowie eine Dilatation des linken Ventrikels gekennzeichnet (24).

1.1.3 Fibrose

Kardiomyozyten bilden etwa zwei Drittel der gesamten Herzmuskelmasse (25), während zwei Drittel der Gesamtzellanzahl im Myokard von Zellen wie Endothelzellen, Fibroblasten, Neuronen und anderen Zellen repräsentiert werden (26). Im Herzen produzieren Fibroblasten Kollagen und sind somit essentiell für den Aufbau der EZM, die wiederum als eine Art Stützgerüst für die strukturelle sowie funktionelle Integrität des Myokards entscheidend ist. Fibroblasten und Kardiomyozyten sind in die EZM eingebettet und miteinander über eine Reihe von membranständigen Glykoproteinen (z.B. Integrine, Cadherine und Connexine) verbunden. Die EZM selbst präsentiert sich als ein azelluläres drei-dimensionales Gerüstwerk, das vorwiegend aus interstitiellem Kollagen (vor allem Typ I und III) und Proteoglykanen besteht. Abgesehen von der Funktion als Stützgerüst ist die EZM auch für die mechanische, elektrische und chemische Signalübertragung zwischen den Kardiomyozyten essentiell. Angiotensin-II (AT-II) (27), TGF- β (Englisch: Transforming Growth Factor- β) (28,29) sowie Entzündungsmediatoren wie IL-6 (Interleukin-6) (30) und weitere biochemische Signale, aber auch mechanische Kräfte (28), regen Fibroblasten an, die Bestandteile der EZM zu produzieren. Neben Wachstumsfaktoren sind in der EZM jedoch auch Matrix-Metalloproteasen (MMPs) lokalisiert, die für den Abbau von Proteinen und somit für eine Homöostase innerhalb der EZM sorgen. MMPs werden durch die Produktion von Strukturproteinen aktiviert. Beim Abbau dieser Proteine kommt es jedoch zu einer Entzündungsreaktion die wiederum über Zytokine Fibroblasten stimuliert, EZM-Proteine zu produzieren. Somit handelt es sich, unter normalen Bedingungen, um einen sich selbstregulierenden Kreislauf. Kommt es jedoch zu einer Störung in diesem Kreislauf (wie z.B. bei der chronischen Drucklasterhöhung) und das Gleichgewicht zwischen den stimulierenden und hemmenden Faktoren des Proteinumsatzes ist nicht mehr gegeben, wird überproportional viel Bindegewebe im Herzen produziert und es kommt zur myokardialen Fibrosierung (31).

Die vermehrte Einlagerung von Kollagen bewirkt eine zunehmende Versteifung des Myokards, einhergehend mit einer verminderten Relaxation des Ventrikels und führt (zusammen mit der Hypertrophie der Kardiomyozyten und ischämischen Ereignissen) somit zu einer diastolischen Dysfunktion (mit erhaltener Pumpfunktion) oder zu einer systolischen

Dysfunktion, die durch eine Dilatation des linken Ventrikels mit nachfolgender Verschlechterung der Kontraktilität des Myokards (reduzierte Auswurfraction) charakterisiert ist (32).

1.1.4 Vaskuläres Remodeling

Chronischer Bluthochdruck führt in der Mikrozirkulation zu zwei typischen Veränderungen (33): (1) einer Rarifizierung, also einer Dichteabnahme, des mikrozirkulären Netzwerks im Gewebe, und (2) zu einem vaskulären Remodeling, welches durch strukturelle Veränderungen von Arteriolen und Venolen eine Lumeneinengung dieser zur Folge hat.

Die Rarifizierung kann in eine funktionelle sowie in eine strukturelle Form eingeteilt werden: bei der funktionellen Rarifizierung soll es aufgrund erhöhter Sensibilität auf vasokonstriktorische Stimuli (z.B. Noradrenalin, AT-II (34)) zu einer Gefäßverengung bis hin zur Nichtperfusion kommen. Die strukturelle Rarifizierung beschreibt die Abwesenheit von Gefäßen der Mikrozirkulation (35).

Am vaskulären Remodeling, das durch einen chronischen Bluthochdruck ausgelöst wird, sind unter anderem reaktive Sauerstoffradikale (ROS, Engl. Reactive Oxygen Species), Entzündungsmediatoren, MMPs und das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) beteiligt (36). Die Hypertrophie der Kardiomyozyten führt bei gleichbleibender oder gar verminderter Kapillardichte zu einer verminderten Perfusionskapazität des Myokards (33,37)

Chronischer Bluthochdruck gilt als Verursacher einer gestörten Minderperfusion durch eine Funktionsstörung der glatten Muskelzellen in den Gefäßwänden, die nur vermindert auf Vasodilatoren wie Acetylcholin, CRGP (Engl. Calcitonin Gene-Related Peptide) oder lokale Wärmeapplikation (38) sowie Stickstoffmonoxid (NO, Engl. Nitric Oxide) reagieren. Verstärkt wird das Problem durch eine Inaktivierung von NO durch freie Sauerstoffradikale (39), welche unter mechanischer Belastung sowohl von Endothelzellen als auch von Kardiomyozyten (von den Mitochondrien) vermehrt freigesetzt werden (40).

1.1.5 Zelltod

Im Rahmen des linksventrikulären Remodelings kommt es zu einem sukzessiven Verlust von Kardiomyozyten (14,41), die durch Bildung/Produktion von neuem Bindegewebe (durch Fibroblasten) ersetzt werden. Dieser Zellverlust steht in unmittelbarem Zusammenhang mit dem Übergang einer kompensierten zu einer dekompensierten Hypertrophie (42). Bei diesem Vorgang sind alle drei Formen des Zelltods, oft mit sich überlappenden Grenzen, beteiligt: Apoptose, Nekrose und Autophagie-assoziiertes Zelltod (siehe Abbildung 2).

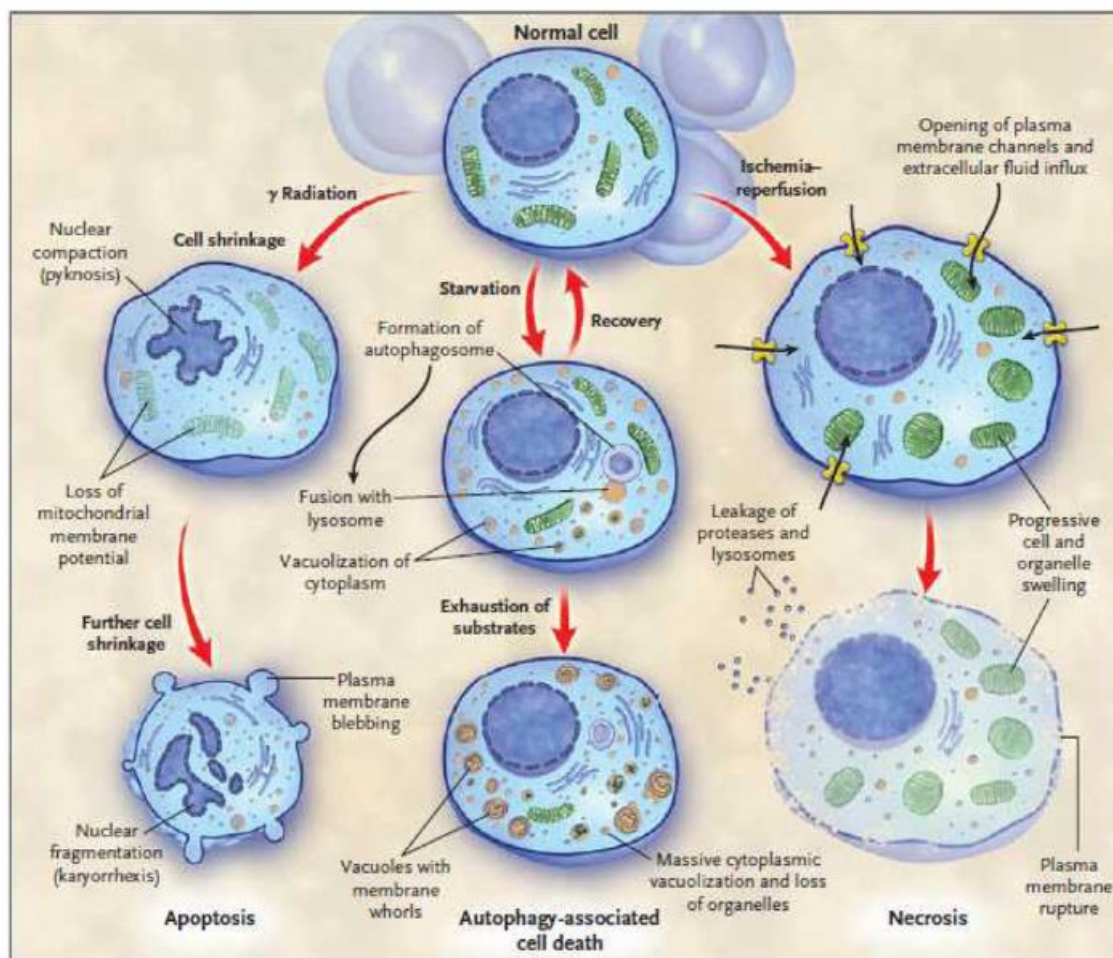


Abbildung 2: Formen des Zelltods. Bei der Apoptose (programmierter Zelltod) kommt es zum Schrumpfen der Zelle und einer Fragmentierung des Zellkerns. Die Nekrose geht mit einer Zellschwellung einher, gefolgt von einer Ruptur der Plasmamembran und Freisetzen der Zytoplasmabestandteile. Der Autophagie-assoziierte Tod stellt eine komplizierte Sonderform dar, mit oft vorausgehendem Versuch der Zelle, einer Erschöpfung der Energiereserven entgegenzuwirken. Abgeänderter nach Vorlage von (Hotchkiss *et al.* 2009).

Die Apoptose ist ein genau regulierter Prozess, der entweder durch extrinsische (z. B. durch die Bindung von Fas oder TNF- α an ihre membranständigen Rezeptoren) oder intrinsische (z. B. Hypoxie, Ischämie-Reperfusion und oxidativer Stress) Stimulation aktiviert wird (43,44). Vor allem Proteasen aus der Caspase-Familie spielen bei der apoptotischen Signalkaskade eine bedeutende Rolle. Im Rahmen von kardiovaskulären Erkrankungen kann die durchschnittliche Apoptoserate bis zu fast 1% betragen. Dies ist eine beträchtliche Steigerung, da davon ausgegangen wird, dass Kardiomyozyten unter Normbedingungen keine Apoptose eingehen (42,45,46).

Auch bei der Nekrose handelt es sich um einen teilweise regulierten Zelluntergang, welcher mechanischen und chemischen Zellschädigungen folgt. Vor allem die insuffiziente Sauerstoffversorgung der hypertrophen Kardiomyozyten schädigt Mitochondrien, was zu einem verminderten intrazellulären ATP-Spiegel und somit zu einer Störung der Kontraktilität der Zellen führt. Der nekrotische Zelltod ist durch eine Zellschwellung bis hin zur Membranruptur und Freisetzung des Zellinhalts gekennzeichnet. Diese ruft eine Entzündungsreaktion mit pathologischen Konsequenzen für die umliegenden Zellen hervor (47).

Wann es zur Apoptose und wann zur Nekrose kommt, ist bisher noch nicht ganz geklärt. Ein entscheidender Faktor könnte dabei der intrazelluläre ATP-Vorrat sein. Da Apoptose ein ATP-abhängiger Prozess ist, könnte bei niedrigen ATP-Levels der nekrotische Zelltod eine größere Rolle spielen.

Der Autophagie-vermittelte Zelltod wird in den folgenden Kapiteln, die das Thema Autophagie behandeln, näher beschrieben.

1.2 Autophagie – ein körpereigener Recyclingmechanismus

1.2.1 Grundlegendes

Autophagie (zusammengesetzt aus den griechischen Worten „auto“ für „selbst-“ und „phagein“ für „essen“) bezeichnet einen Prozess, bei dem Zytoplasmabestandteile, Organellen (z. B. geschädigte Mitochondrien) und Proteine (z. B. toxische Proteinaggregate) mithilfe von Lysosomen abgebaut werden. Dieser Abbauprozess ist als wesentlicher Faktor in eine Reihe physiologischer sowie pathologischer Prozesse im Körper involviert, wie etwa dem Zellwachstum, Zelltod, dem Altern und der Immunabwehr. Drei Formen der

Autophagie sind bisher bekannt: Mikroautophagie, Makroautophagie (weiter „Autophagie“ benannt) und die Chaperon-vermittelte Autophagie (48–50).

Der Autophagie-Prozess startet mit der Phagophore, einer Isolationsmembran, die im Zytoplasma nahe dem endoplasmatischen Retikulum Zytoplasmaportionen umschließt und, nun Autophagosom genannt, vom Rest des Zellinneren abkapselt. Das Autophagosom, inzwischen von einer Doppelmembran umgeben, dockt schließlich an ein Lysosom an, fusioniert mit diesem und setzt seinen Inhalt frei. Im Inneren dieses sogenannten Autolysosoms (oder Autophagolysosoms) werden Zellbestandteile mittels Hydrolasen abgebaut und dann erneut ins Zytosol abgegeben (siehe Abbildung 3).

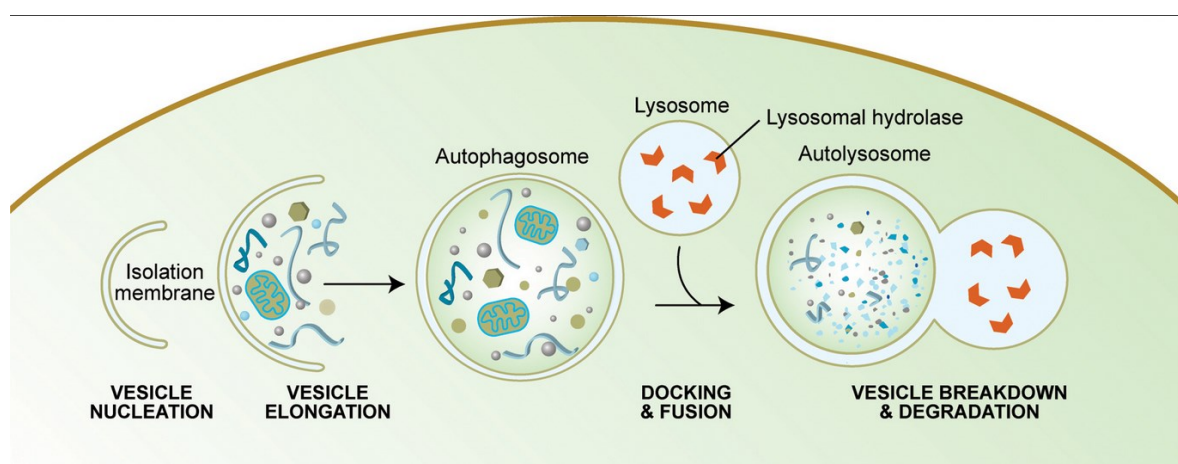


Abbildung 3: Mechanismus der Autophagie. Eine Isolationsmembran (Phagophore) umschließt Portionen von Zytoplasma und bildet das von einer Doppelmembran umgebene Autophagosom. Durch Andockung an ein Lysosom kommt es zur Bildung des Autophagolysosoms und zum Abbau der Zytoplasmabestandteile. Dieser Vorgang kann der Zelle u.a. zur Bereitstellung von Energie dienen. Abgeändert nach Vorlage von (Meléndez & Levine 2005).

Autophagie dient somit dem Abbau und Recycling von Zellbestandteilen (die gewonnene Energie wird der Zelle zugeführt) sowie der Qualitätskontrolle und dem Umsatz von Proteinen und Zellorganellen. Sie ist daher unabdingbar für die strukturelle und funktionelle Homöostase innerhalb einer Zelle. Autophagie wirkt als Mitbestimmer über Leben und Tod einer Zelle, und eine Beeinträchtigung dieses Signalweges hat schwerwiegende Folgen wie abnormales Zellwachstum oder Zelltod zur Folge (51).

Autophagie ist in Perioden von Nahrungskarenz (52), bei einem Mangel an Wachstumsfaktoren (53), bei ER-Stress (u.a. durch die Akkumulation missgefalteter

Proteine, (54)), durch pathogene Infektionen (55–57), oxidativen Stress (58–60) und bei körperlicher Aktivität hochreguliert (61). Autophagie dient so der Aufrechterhaltung zellulärer Energielevel und somit dem Zellüberleben (62–64).

1.2.2 Autophagie im Herzen unter Normbedingungen

Im Herzen herrscht unter normalen Bedingungen ein basaler Level an Autophagie, welcher für den Umsatz von Organellen zuständig ist. Freie Sauerstoffradikale, die, gebildet unter dem Stimulus einer zunehmenden Druckbelastung, immer mehr zur Behinderung der Zellaktivität führen, greifen vor allem Zellen mit hohem Sauerstoffbedarf an. Gebildet werden ROS dabei überwiegend/hauptsächlich von Mitochondrien, die vermehrtem Stress ausgesetzt sind (65). Der Umsatz von Mitochondrien ist ein dynamischer Prozess der durch ein Zusammenspiel von Zerfall und Vereinigung gekennzeichnet ist. Die Vereinigung von Mitochondrien ist ein selektiver Prozess, der wiederum über ihren Zerfall mitbestimmt. Beschädigte/Defekte Mitochondrien werden anschließend zu den Zielscheiben der Autophagie (66), ein Prozess der als „Mitophagie“ bezeichnet wird. Mitophagie dient als Qualitätskontrolle der Mitochondrien und ist somit besonders für Zellen mit hohem Sauerstoffbedarf sowie einer langer Lebensdauer (wie Kardiomyozyten) essentiell.

Neben der Qualitätskontrolle von Mitochondrien gehören zu den kardioprotektiven Eigenschaften der Autophagie noch die ATP-Produktion und Proteinsynthese, die Regulierung des Redoxsystems und der zellulären Ionenhomöostase sowie die Elimination von akkumulierten (toxischen) Proteinaggregaten (67–69).

1.2.3 Autophagie im Herzen bei chronischer Druckbelastung

Bisher ungeklärt ist die Frage, ob Autophagie im Herzen unter Druckbelastung protektiv oder maladaptiv ist. Die Studie von Zhu et al. (2007) zeigte im Herzen einen Anstieg von Autophagie unter Druckbelastung. Dabei kommt es in der Frühphase zu einem drastischen Anstieg der Autophagieaktivität, die jedoch im Laufe der Erkrankung wieder abnimmt, jedoch konstant erhöhte Level verglichen mit der Kontrollgruppe zeigt. Diese Studie zeigte auch, dass es bei einer Hemmung der Autophagie zu einem verminderten Remodeling kommt, umgekehrt verursacht eine Überexpression von Beclin (das humane Ortholog zu Atg 6 in Hefezellen) ein gesteigertes Remodeling unter chronischer Nachlasterrhöhung. Dies führte zum Konzept bzw. zur Theorie, dass Autophagie einen schädlichen Einfluss auf die Herzinsuffizienz ausübt und sogar zum Zelltod führen kann.

Gleichzeitig existieren aber auch die kardioprotektiven Eigenschaften von Autophagie, wie die Entfernung von beschädigten Proteinen und Organellen aus der Zelle, die Erhaltung der zellulären Homöostase und somit die Verhinderung von Apoptose, sowie die Beschaffung von ATP, welches besonders bei Druckbelastung von den Kardiomyozyten in höherem Maße benötigt wird (70). Die Mehrbelastung führt in den Herzmuskelzellen zu einer Anhäufung von missgefalteten Proteinen, die zytotoxisch sind, und als potente Stimulatoren der Autophagie agieren. Somit kann in frühen Phasen einer Herzinsuffizienz ein Abbau dieser für die Kardiomyozyten schädlichen Abfallprodukte mittels Autophagie gewährleistet werden. Dasselbe gilt auch für defekte Mitochondrien, die mittels Autophagie eliminiert werden. Kommt es jedoch zu einem exzessiven Abbau von Mitochondrien, kann das wiederum negative Effekte auf Kardiomyozyten haben und schlussendlich zu Autophagievermitteltem Zelltod führen (71). Somit gilt die Modulation (Aktivierung) der Autophagie als vielversprechender Therapieansatz zur Behandlung von durch Drucküberlast induzierten Herzkrankheiten (z.B. Herzinsuffizienz). Jedoch ist unbekannt, welches Maß an Autophagie notwendig ist, um eine schützende Funktion auf das Herz in Stresssituation auszuüben, und welche potenziellen Modulatoren existieren, die eine Steigerung der Autophagieaktivität im Herzen bewirken.

1.3 Spermidin – Ein Stimulator der Autophagie

1.3.1 Polyaminbiosynthese

Spermidin gehört zusammen mit Putrescin und Spermin zur Gruppe der biogenen Polyamine (Abbildung 4), welche in nahezu allen eukariotischen Zellen, einschließlich die des Menschen, vorkommen (72).

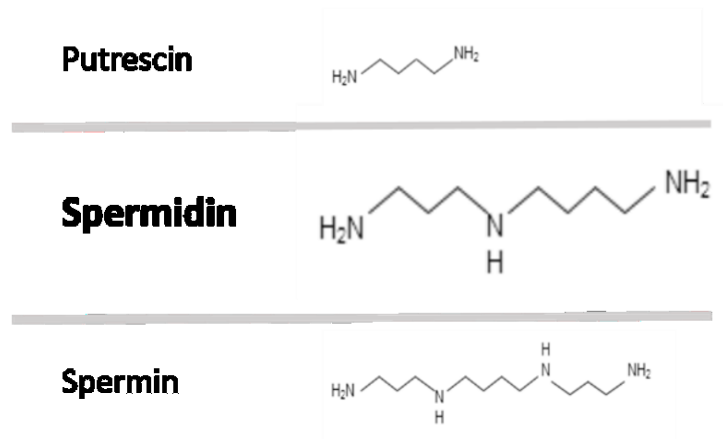


Abbildung 4: Biogene Amine. Oben angeführt sind die Strukturformeln der natürlich vorkommenden Polyamine: Putrescin, Spermidin und Spermin. Abgeändert nach Vorlage von (Minois, Carmona-Gutierrez & Madeo, 2011).

Polyamine werden über verschiedene Wege synthetisiert; so gibt es die zelluläre *in situ* Biosynthese aus Aminosäuren und die Herstellung durch die bakterielle Darmflora. Eine Hauptzufuhrquelle von Polyaminen stellt die tägliche Ernährung dar, vor allem sind hier die mediterrane sowie die asiatische Diät, die besonders polyaminreich sind, zu erwähnen. Höhere Polyaminkonzentrationen sind in pflanzlichen Produkten wie z.B. Brokkoli, Blumenkohl, Sojabohnen und Grapefruits enthalten, aber auch in Hühnerfleisch (73–76). Die Aufnahme der Polyamine erfolgt hauptsächlich über die Darmmukosa (77). Für die *in situ* Biosynthese der drei Polyamine (Putrescin, Spermidin und Spermin) werden die Aminosäuren Methionin und Arginin benötigt (siehe Abbildung 5).

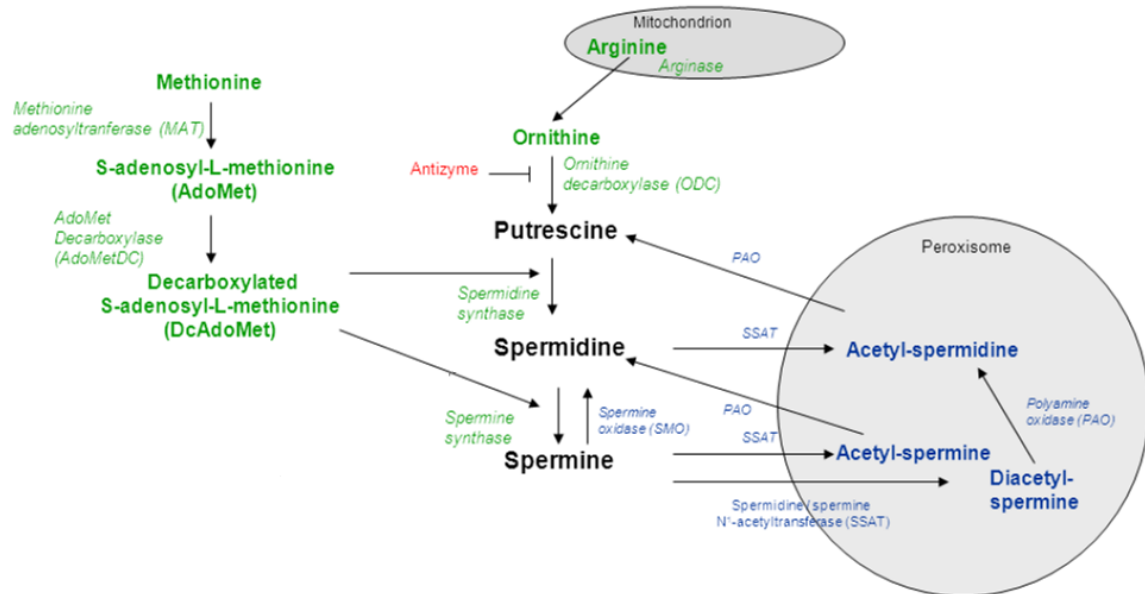


Abbildung 5: Polyamin-Stoffwechsel. In grün: Polyamin-Biosynthese, ausgehend von den Aminosäuren Methionin und Arginin; in blau: Polyamin-Abbau; in rot: hemmendes Protein; Polyamine können untereinander interkonvertiert werden: Spermidin entsteht als Zwischenprodukt bei der Bildung von Spermin aus Putrescin. Abgeändert nach Vorlage von (Minois, Carmona-Gutierrez & Madeo 2011).

1.3.2 Wirkungsweise von Spermidin

Spermidin (und seine verwandten Polyamine) spielt eine essentielle Rolle bei der Proliferation und Differenzierung von Säugetierzellen sowie für die Zellfunktion. Auf zellulärer Ebene stabilisiert Spermidin die DNA sowie die Chromatinstruktur (Histon-Acetylierung) und beeinflusst die Regulation von einigen Transkriptionsfaktoren sowie die Proteinsynthese (78–82). Ein lebensverlängernder Effekt auf Säugetierzellen und andere lebende Organismen, sowie eine negative Korrelation mit dem Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen ist beschrieben worden (83,84).

Versuche an ischämischen neonatalen Kardiomyozyten von Ratten, die anschließend reperfundiert wurden, zeigten, dass Spermidin zu einer allgemein höheren Funktionsfähigkeit dieser Zellen, sowie zu einer geringeren Apoptoserate führt. Spermidinbehandelte Kardiomyozyten zeigten geringere intrazelluläre Kalziumkonzentrationen sowie weniger Cytochrom c Freisetzung unter I/R-Bedingungen als die Kontrollgruppe (85). Stefanelli et al. (2000) zeigten wiederum in ihrer Studie, dass Spermidin, wenn auch nur in geringer Ausprägung, die direkte Freisetzung von Cytochrom

c aus kardiomyozytären Mitochondrien induziert. Dieser Prozess, der für die Aktivierung der Caspase-Kaskade wesentlich ist, führt zur Apoptose (86). Die Rolle von Spermidin im Metabolismus von Kardiomyozyten bleibt umstritten, ebenso wie die Interpretation von erhöhten Spermidinkonzentrationen in Kardiomyozyten unter pathologischen Bedingungen. Um herauszufinden ob Spermidin vorrangig protektive oder maladaptive Eigenschaften hat, ist mehr Forschung auf diesem Gebiet notwendig (87).

1.3.3 Autophagie-unabhängige Effekte von Spermidin

Spermidin gilt als ein Hemmer der neuronalen NO-Synthase (NOS) (88,89). Jedoch zeigte sich erst kürzlich, dass Spermidin in Ratten den Gedanken-Verarbeitungsprozess im Hippocampus stimuliert und vieles spricht dafür dass dieser Effekt über das Enzym NO-Synthase vermittelt wird. Die neuronale NOS und endotheliale NOS sind bei der Produktion des Neurotransmitters Stickstoffmonoxid im Hippocampus entscheidend. In der Studie von Guerra et al. (2006) resultierte eine Hemmung der NOS in einem Verlust der positiven Effekte von Spermidin auf den Gedanken-Verarbeitungsprozess (90). Dies spricht also wiederum für eine Stimulation der NOS durch Spermidin. Das durch die drei Unterarten der NOS gebildete Stickstoffmonoxid ist ein entscheidendes Signalmolekül im kardiovaskulären System. Es wirkt gefäßerweiternd (vasodilatativ), antithrombotisch und hemmt die Leukozytenadhäsion an der Gefäßwand. Eine niedrige Bioverfügbarkeit von NO ist mit dem Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen vergesellschaftet. Im Herzen ist die Funktion von NO durchaus komplex: während es bei einem NO-Mangel zu einer Gefäßverengung mit resultierender Minderversorgung des Myokards kommt, führen hohe Level von NO, wie sie u.a. bei Herzinsuffizienz gefunden werden, zu einem Verlust von Kardiomyozyten sowie zu Kontraktilitätsstörungen. Des Weiteren verschlechtert NO im Herzen bei β -adrenerger Stimulation die Reizantwort und führt zu einer vermehrten Bildung von ROS (91,92). Für detaillierte Informationen über NO und seine kardialen Effekte sind u.a. die Reviews von Cotton, Kearney & Shah (2002) bzw. von Dobutovic (2011) empfehlenswert.

Die Komplexität der kardialen Effekte von NO lässt bewusst werden, dass es weiterer Forschung bedarf um die Rolle von Spermidin nicht nur im Hinblick auf NO, sondern darüber hinaus im Zusammenhang mit einer Herzinsuffizienz, zu identifizieren

2 Hypothese

Die vorliegende Arbeit ist der Frage nachgegangen, ob eine orale Spermidinabgabe protektive Effekte auf das Herz unter erhöhter Drucklast ausübt. Hierfür wurden Wildtypmäuse (C57BL/6) verwendet, die einer Aortenkonstriktion (TAC, Engl. Transverse Aortic Constriction) unterzogen worden waren um die Drucklast zu erhöhen und somit Hypertrophie und Herzinsuffizienz zu induzieren (Rockmann et al., 1991).

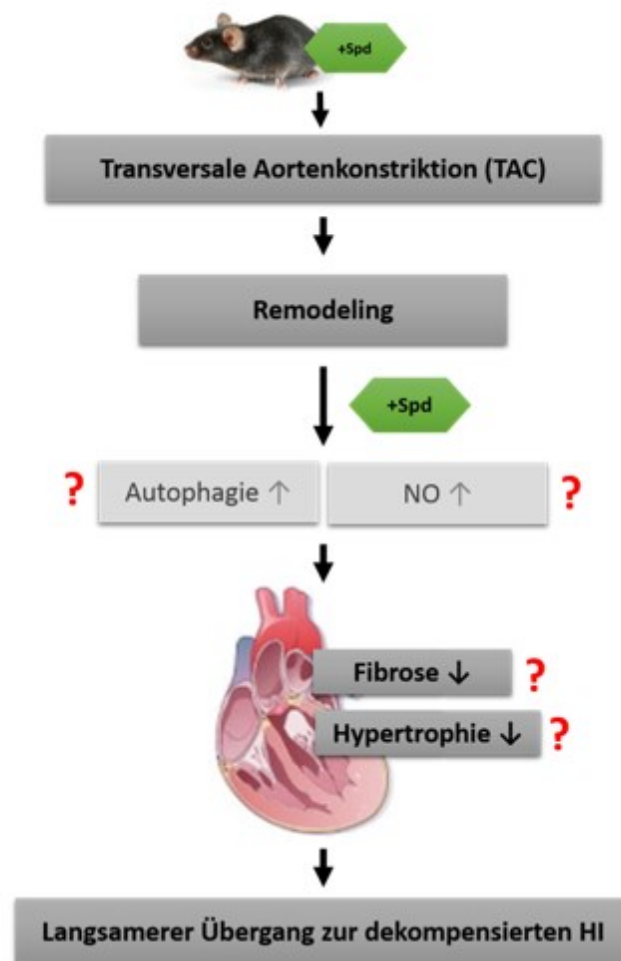


Abbildung 6: Hypothese. Spermidinbehandelte und Kontroll- (keine Spermidinabgabe) Wildtyp-Mäuse wurden TAC unterzogen um die Drucklast zu erhöhen. Chronische Drucküberlast führt zum kardialen Remodeling, gekennzeichnet/charakterisiert durch Hypertrophie und vermehrte Fibrose. Wir haben die Auswirkungen einer Spermidinbehandlung anhand der Analyse von eventuellen Veränderungen der Parameter Fibrose und Hypertrophie getestet. Ein langsames Fortschreiten der pathologischen Veränderungen könnte auf kardioprotektive Effekte von Spermidin und einen verlangsamten Übergang zur dekompensierten Herzinsuffizienz hinweisen. Gesteigerte/erhöhte Autophagierate und/oder erhöhte NO-Bioverfügbarkeit im Herzen werden als potenzielle Mechanismen für Spermidineffekte verantwortlich gemacht. HI = Herzinsuffizienz; Spd = Spermidin; NO = Stickstoffmonoxid; Abgeändert nach Vorlage von (Anand 2008) & (Nishida *et al.* 2009)

3 Material und Methoden

3.1 Mäuse und Spermidingabe

Für die Versuche wurden Wildtyp C57BL/6 Mäuse (WT) verwendet. Nach dem Absetzen vom Muttertier (Tag 28) begann bei der Hälfte der Mäuse eine orale Spermidingabe, welche bis zur Euthanasie der Tiere fortgesetzt wurde (Abbildung 7). Dem Trinkwasser der Versuchsgruppe wurden 3 mM Spermidin beigemischt um eine stressfreie und konstante Applikation *ad libitum* zu ermöglichen. Die Dosierung entsprach einer polyaminreichen Nahrungsaufnahme (84). Die Überprüfung der Spermidinaufnahme fand zwei Mal wöchentlich mittels Kontrolle des Trinkwasserkonsums der Versuchstiere statt. Die Kontrollgruppe bekam über den Versuchszeitraum hinweg unbehandeltes (Spermidin-freies) Trinkwasser (Abbildung 7).

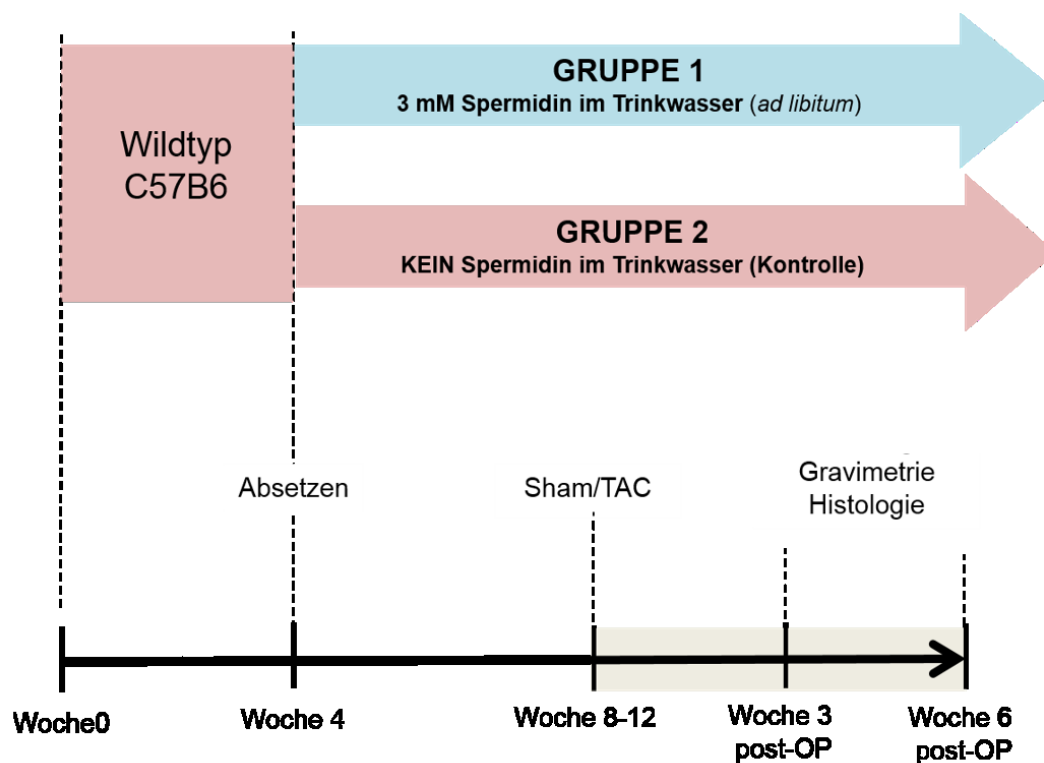


Abbildung 7: Experimenteller Plan.

3.2 Transversale Aortenkonstriktion (TAC)

Die Methode der transversalen Aortenkonstriktion (TAC, Engl. transverse aortic constriction) ist bei Mäusen die gängige Methode um eine drucklastinduzierte Herzhypertrophie und (schlussendlich) ein Herzversagen herbeizuführen (93). Die Verengung der Hauptschlagader auf Höhe des Aortenbogens stellt eine Imitation einer menschlichen Aortenstenose dar, mit den dementsprechenden pathologischen Konsequenzen für das Herz (94). Die Versuchstiere im Alter von 8-12 Wochen (Männchen mit einem Körpergewicht von 24 ± 1 Gramm, Weibchen mit einem Körpergewicht von 20 ± 1 Gramm) wurden von Dr. Simon Sedej (Abteilung für Kardiologie) operiert (33).

Nach dem Einleiten der Narkose mittels Ketanest® (Pfizer, USA) und Xylazin (Bayer, Deutschland) erfolgte der Hautschnitt auf Höhe des Sternums und, nach einer Sternotomie, die schrittweise Präparation der transversalen Aorta zwischen dem *Truncus brachiocephalicus* und der linken *Arteria carotis communis*. Nach Darstellung und Mobilisierung des Aortenbogens wurde anschließend ein chirurgischer Faden der Stärke 6-0 unter der Aorta hindurchgeführt, eine stumpfe Nadel (27 Gauge, als Abstandhalter) auf die Aorta gelegt und der Faden um Aorta und Abstandhalter verknötet (Abbildung 8). Nach Entfernung des Abstandhalters erfolgte der Hautverschluss.

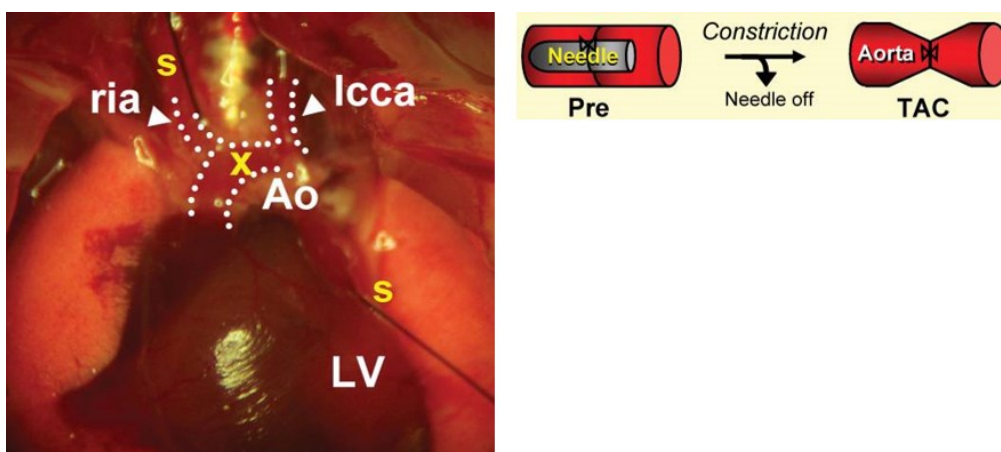


Abbildung 8: Transversale Aortenkonstriktion (TAC). Links: Die Aortenkonstriktion wurde mithilfe eines Fadens (s) durchgeführt. Dieser wurde auf Höhe der thorakalen Aorta (Ao), zwischen dem Ursprung des *Truncus brachiocephalicus* (ria) und der linken *Arteria carotis communis* (lcca) angelegt und verknötet. (LV: linker Ventrikel); Rechts: Vor und nach erfolgter TAC. Eine 27-Gauge Nadel (Abstandhalter) wurde verwendet um das

Ausmaß der Aortenkonstriktion zu standardisieren. Abgeändert nach Vorlage von (Yamada *et al.*, 2006).

Im Gegensatz dazu wurde bei der Kontrollgruppe, welche einer Sham-Operation unterzogen wurde, die transversale Aorta lediglich dargestellt und mobilisiert, dies gefolgt von einem Hautverschluss.

Durch die Durchführung der TAC-Operation erwartete man sich nach 3 Wochen Zeichen eines kardialen Remodelings, wie etwa eine Zunahme des relativen Herzgewichts und des interstitiellen Kollagengehalts (95).

Die postoperative Nachsorge umfasste eine Schmerzbehandlung mittels dem Novalgine®-Wirkstoff Metamizol (Sanofi-Aventis, Deutschland) im Trinkwasser (15 Tropfen/100 ml Trinkwasser über eine Woche) unter gleichzeitiger Beobachtung der Tiere auf Anzeichen von Schmerzen, Wundheilungsstörungen oder akuter Herzinsuffizienz.

3.3 Versuchsgruppen

Insgesamt ergaben sich 6 zu vergleichende Versuchsgruppen:

- 3 Wochen nach Sham, ohne Spermidinbehandlung (Sham, 3w, -Spd)
- 3 Wochen nach Sham, mit Spermidinbehandlung (Sham, 3w, +Spd)
- 3 Wochen nach TAC, ohne Spermidinbehandlung (TAC, 3w, -Spd)
- 3 Wochen nach TAC, mit Spermidinbehandlung (TAC, 3w, +Spd)
- 6 Wochen nach TAC, ohne Spermidinbehandlung (TAC, 6w, -Spd)
- 6 Wochen nach TAC, mit Spermidinbehandlung (TAC, 6w, +Spd)

Da bei Sham-Mäusen keine Veränderungen am Herzen (z. B. Hypertrophie und Fibrose) 3 bzw. 6 Wochen nach dem chirurgischen Eingriff erwartet wurden (95), wurde nur eine Sham Gruppe in die Studie einbezogen.

3.4 Schnittherstellung

Mit dem Rotationsmikrotom COOLCUT HM360 (MICROM International GmbH, Deutschland) wurden die in Paraffin eingebetteten Herzen zu Schnitten (Tranversalebene, kurze Achse) von jeweils 5 Mikrometer Schichtdicke prozessiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass sämtliche Herzschnitte auf Höhe der Papillarmuskeln gefertigt wurden um eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

3.5 Färbungen

3.5.1 Pikrosiriusrot-Färbung (Kollagenanteil)

Für die Darstellung des myokardialen Kollagengehalts wurden die Herzschnitte mit Pikrosirius-Rot (PSR) gefärbt. Pikrosirius-Rot ist ein Farbstoff, der spezifisch an Kollagenfasern bindet und diese in einem gelbrot bis roten Farbton darstellt (96). Mit dem Färbeautomat Tissue-Tek® DRS™ 2000E-D2 (SAKURA, Japan) konnte die PSR-Färbung der Herzschnitte, nach 20-minütigem Verweilen im Brutschrank bei 64°C, automatisiert durchgeführt werden. Das Färbeprotokoll beinhaltet zu allererst das Entparaffinieren in Xylol und einer absteigenden Ethanolreihe, gefolgt von einer Spülung in destilliertem Wasser. Die Schnitte werden dann erst in Phosphomolybdän-Säure inkubiert und anschließend gefärbt, wobei hierfür die Schnitte für 60 bis 90 Minuten in einem Gemisch aus Sirius-Rot und mit Pikrinsäure gesättigtem Wasser ruhen. Anschließend wurden die Schnitte in 0,01 M HCl gewaschen. Zum Abschluss erfolgte eine Entwässerungsreihe, bestehend aus 100% Ethanol (3 Durchgänge à 3 Minuten) und Xylol (Ein Durchgang à 3 Minuten). Die Objektträger wurden nach dem Färbeprogang bei noch feuchtem Zustand der Herzschnitte mit GLC™ Mounting Medium (Sakura, Niederlande) versehen, mit Deckgläsern luftdicht verschlossen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Reagenzien wurden von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Österreich) gekauft, wenn nicht anders hingewiesen.

3.5.2 Fluoreszenzfärbung (Extrazelluläre Matrix)

Zuerst wurden die Schnitte für etwa 30 Minuten bei 64°C im Brutschrank gelagert und in einer anschließenden Entparaffinierungsreihe, bestehend aus Xylol und Ethanol in absteigenden Konzentrationen, entparaffiniert. Als nächstes folgte die Antigendemaskierung

(oder auch „Antigen Retrieval“). Da viele Epitope durch die Fixierung und die Paraffineinbettung der Gewebe ihre Eigenschaft verlieren, von komplementären Antikörpern ausreichend gebunden zu werden, soll eine Epitopdemaskierung (sogenanntes Antigen-Retrieval) dazu dienen, diese abgeschwächte oder verlorengegangene Immunreaktivität wiederherzustellen um ein zufriedenstellendes Färbeergebnis zu gewährleisten. Für das Antigen-Retrieval wurde die Dako® Target Retrieval Solution mit pH 9 (Dako, Dänemark) verwendet. Die Demaskierung selbst wurde mittels der Decloaking Chamber DC2002 (Biocare Medical, USA) durchgeführt. Die Target Retrieval Solution wurde erst 1:10 mit Pufferlösung verdünnt und der pH der Lösung mittels Salzsäure auf 6,1 eingestellt.

Die Objektträger wurden in ein Coplin Gefäß, gefüllt mit der Target Retrieval Solution, und dieses dann in die Decloaking Chamber gegeben. Hier wurden die Schnitte dann bei 120°C für 20 Minuten inkubiert und anschließend für weitere 10 Minuten auf 85°C abgekühlt. In PBS wurden die Schnitte weiter abgekühlt und anschließend mit destilliertem Wasser gespült.

Für die Färbung der extrazellulären Matrix und somit der indirekten Darstellung der Kardiomyozytengröße wurde Wheat-Germ-Agglutinin (WGA), getaggt mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor® 488 (Invitrogen, USA), benutzt. WGA bindet an Sialinsäuren sowie N-Acetyl-Glycosaminoglykanen, beide Bestandteile der Plasmamembran. Unter Licht mit einer maximaler Exzitationslänge von 495 Nanometer und maximalen Emissionslänge von 519 Nanometer stellt es die extrazelluläre Matrix in grüner Farbe dar. Zu allererst erfolgte die Mischung einer Stammlösung. Hierbei wurde WGA 1:1 mit PBS gemischt und bei -20°C lichtgeschützt gelagert. Für die Färbung selbst wurde eine 1:100 Verdünnung der benötigten Menge an Stammlösung mit PBS angefertigt und auf die noch feuchten Herzschnitte aufgetragen. Dabei wurden die Herzschnitte, zur präziseren Applikation der Färbelösung, vorher mit einem Dako® PAP-Pen (Dako, Dänemark) umrandet. Die Objektträger wurden anschließend über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C gelagert. Am darauffolgenden Tag wurden die Objektträger mit ProLong® Gold Antifade Reagent betropft und mit Deckgläsern luftdicht verschlossen. Dabei wurden die Ränder der Deckgläser mit Nagellack bestrichen und die Objektträger zum Trocknen des Nagellacks je nach Bedarf lichtgeschützt im Kühlschrank verstaut.

3.6 Bilddarstellung und Bildaufnahme

3.6.1 Aperio Scanner

Die mit Pikrosirius-Rot gefärbten Schnitte wurden mithilfe des Aperio ScanScope™ Model T3 (Aperio Technologies Inc., Model T3, USA) und einem *Plan Apo* Objektiv mit 20-facher Vergrößerung, NA (Numerical aperture) = 0,75; Nikon, Japan) eingescannt und als TIF-Format gespeichert (Software: *ScanScope Console*). Mittels der Software *Image Scope* konnten die Bilder zusätzlich bearbeitet werden (z.B. Entfernung von überschüssigem Rand).

3.6.2 Fluoreszenzmikroskop

Für das Einscannen der mit WGA behandelten Schnitte wurden das Fluoreszenzmikroskop Olympus BX51 (UPlanApo-Objektiv, 40-fache Vergrößerung, NA = 0,85; Olympus, Japan) mit dem dazugehörigen digitalen Kamerasystem DP71 verwendet. (Software: *CellD*; Olympus, Japan, Version 3.4) Von jedem Herzschnitt wurden an jeweils fünf Regionen im linken Ventrikel eine Bildaufnahme angefertigt und Bilder als TIF-Format gespeichert.

3.7 Analytische Methoden

3.7.1 Analyse des Kollagengehalts

Um eine quantitative Angabe über das Ausmaß an Kollagenfasern pro Herzschnitt geben zu können, wurden jedes Bild in *Image J* aufgerufen, dupliziert und die Duplikatur wie folgend verändert/prozessiert: Eventuelle Störfaktoren, wie Schmutz und intraluminale Erythrozyten wurden erst mittels *Clear*-Funktion entfernt. Danach wurde ebenso der überschüssige Bildrand rund um die Grenzen des Herzgewebes entfernt. Das Bild wurde anschließend im RGB (red-green-blue)-Modus aufgerufen und das „Green“-Bild zur anschließenden Analyse gewählt, da dieses den besten Kontrast ergab.

Für die verblindete Analyse wurden die Messkriterien (veränderbar unter *Set Measurements*) *Area* (Gesamtfläche des Bildes) sowie *Area fraction* (gefärbter Bildanteil) miteinbezogen. Anschließend wurde die Schwelle der Rot-Markierung von kontrastreicherem Gewebe (in unserem Falle das Kollagenewebe, aber auch Störfaktoren wie Gewebsüberlappungen,

Erythrozyten, etc.) mittels *Threshold*-Funktion individuell/manuell gesetzt. Dabei wurde das Duplikat im Green-Modus kontinuierlich mit dem Originalbild der PSR-Färbung verglichen. Sobald das Maß an Rot-Markierung auf dem bearbeiteten Duplikat in etwa dem der rotgefärbten Kollagenfasern auf dem Original entsprach, wurde mittels *Measure*-Funktion der Gehalt an markiertem Bildanteil berechnet. Anschließend wurde die Schwelle der Rot-Markierung erneut erhöht bis der gesamte Herzschnitt, mit Ausnahme von Ventrikellumen, größerer Gefäßlumina sowie eventuell beim Schneiden entstandener Risse, rotmarkiert war. Erneut wurde der rotmarkierte Bildanteil mittels *Measure*-Funktion gemessen (Abbildung 9). Der Kollagenanteil am Myokard wurde dann mittels der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Kollagenanteil} = \left(\frac{\text{der Gesamtanteil des rot gefärbten Kollagengewebes}}{\text{der Gesamtanteil des Herzschnittes}} \right) * 100\%$$

Zu jedem Herz ergaben sich so 4 verschiedene Werte aus welchen schlussendlich ein Mittelwert berechnet wurde.

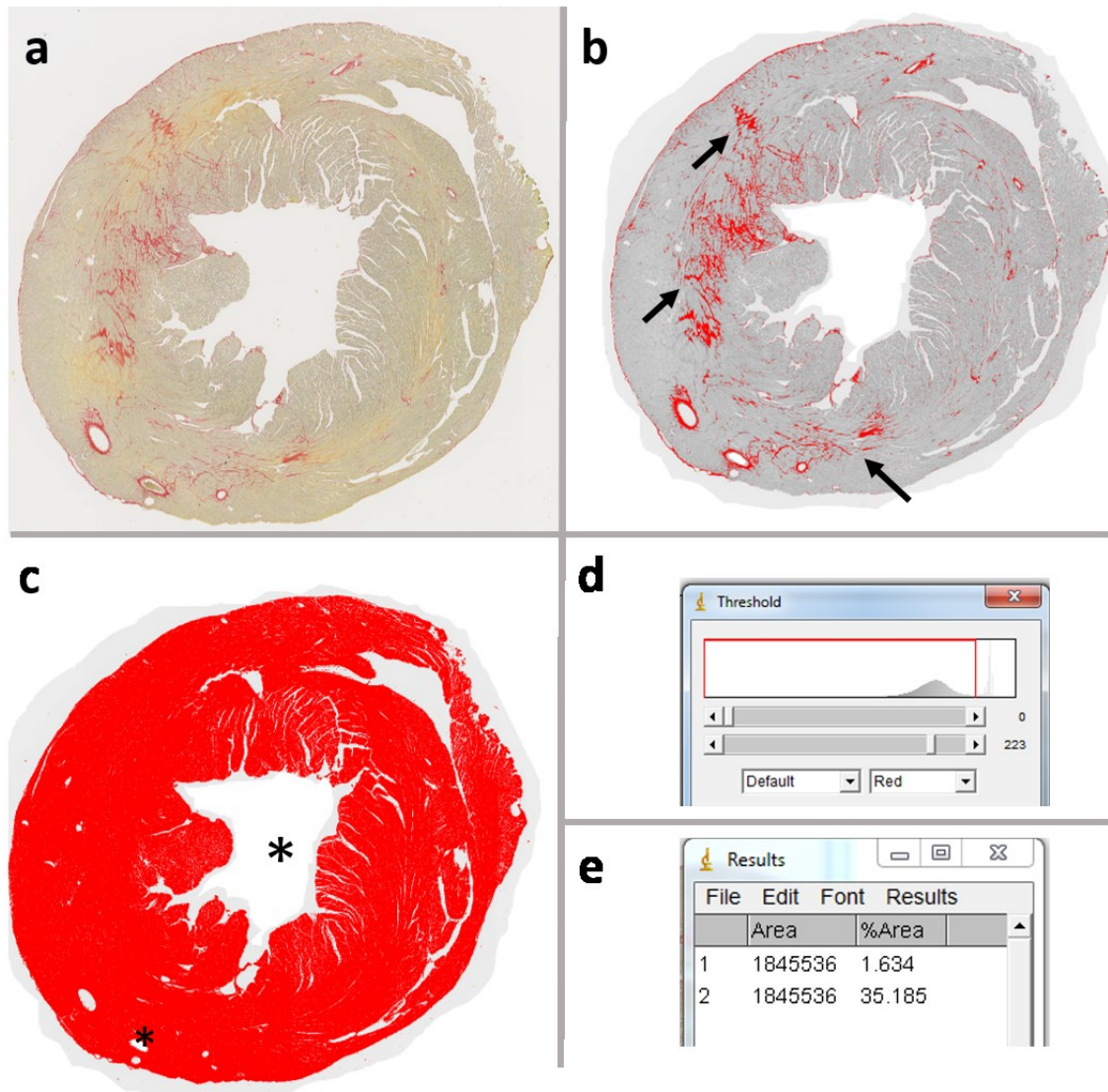


Abbildung 9: Kollagenanalyse mittels Image J. (a) Originalbild der PSR-Färbung vor der Analyse. Eine Duplikatur (b) wurde hinsichtlich ihres Kontrastes verändert und das kollagene (kontrastreichere) Gewebe (↗) rot angefärbt bis es in etwa dem Ausmaß an Kollagen in dem Originalbild (a) entsprach. Anschließend wurde das gesamte Herzgewebe mit Ausnahme von Ventrikelvolumen und größerer Gefäßlumina (*) angefärbt. (d) Setzen der individuellen Schwelle für das Ausmaß der Rotfärbung in den Bildern. (e) Ergebnisse vom Kollagenanteil (Bild b) und Herzschnittanteil (Bild c) im Vergleich zur gesamten Bildfläche.

3.7.2 Analyse der Kardiomyozytengröße

Für die Analyse der Querschnittsflächen der Kardiomyozyten wurden die Aufnahmen der mit WGA behandelten Herzschnitte verwendet. Auf diesen zeigten sich Zellmembranen sowie extrazelluläre Matrix grün, während die Kardiomyozyten selbst ungefärbt (schwarz) waren (siehe Abbildung 10a).

Für die Analyse der Kardiomyozytengröße wurden folgende Einschlusskriterien gewählt: Die Strukturen mussten eine Größe von 70 bis 1000 Pixel (entsprachen in etwa einer tatsächlichen Größe von 15 bis 215 Mikrometer Durchmesser) und eine gewisse „Rundheit“ in ihrer Form vorweisen um in die Messung miteinbezogen zu werden („circularity“ = $0,2 - 1,00$).

Ergebnis zu jedem Bild waren eine grafische Darstellung der in die Analyse miteinbezogenen Zellen (siehe Abbildung 10b-c) sowie eine Liste mit den dazugehörigen Messergebnissen (siehe Abbildung 10d). Aus dieser Liste wurden aus sämtlichen gezählten Zellgrößen Mittelwerte für jedes Herz berechnet.

Von der Analyse ausgeschlossen wurden: unvollständige Zellen (bei welchen nur ein Teil der Zelle auf dem Bild zu sehen war); Strukturen mit einer Größe kleiner als 70 Pixel ($<15 \mu\text{m}$) und größer als 1000 Pixel ($>215 \mu\text{m}$); Strukturen die nicht das notwendige Maß an „Rundheit“ aufwiesen („circularity“ $< 0,2$).

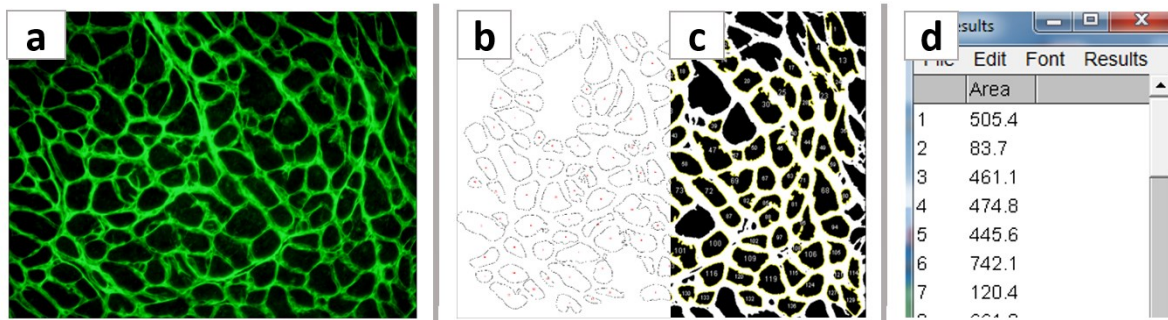


Abbildung 10: Analyse der Kardiomyozytengröße. (a) Originalaufnahme von einem mit WGA gefärbten Herzschnitt unter dem Fluoreszenzmikroskop. In schwarz sind die einzelnen Kardiomyozyten zu sehen, umgeben von extrazellulärer Matrix, hier grün. (b) und (c) zeigen die Analyse der CSA in Image J. Mittels Makro wurden die Kardiomyozyten einzeln erfasst und nummeriert. Nicht vollständig auf dem Bild abgebildete Zellen wurden aus der Analyse ausgeschlossen. (d) zeigt einen Ausschnitt aus der Liste von Ergebnissen, die zu jedem Herzschnitt geliefert wurde. Sämtliche Zellen, die von dem Makro erfasst wurden, sind mit ihrer jeweiligen Größe angegeben.

3.8 Statistische Analyse

Für die statistische Auswertung wurde die Software *SigmaPlot*® (Systat Software Inc, USA) verwendet.

Mittels Shapiro-Wilk-Test, dem Signifikanztest der Wahl bei einer Stichprobenmenge < 50 , wurden die Daten auf Normalverteilung überprüft ($P < 0,05$). Zur Bestimmung von Signifikanzunterschieden zwischen den Gruppen wurde eine 2-Wege-ANOVA (Engl. **A**nalysis of **V**ariance, $P < 0,05$) verwendet. Bei Verwerfen der Nullhypothese wurde die Holm-Sidak Methode als post-hoc Analyse zum multiplen Vergleich der unterschiedlichen Gruppen verwendet ($P < 0,05$). Die Grafiken zeigen die Daten \pm Standardfehler des Mittelwerts (S.E.M.)

4 Ergebnisse

4.1 Gravimetrie

Um das Ausmaß der Hypertrophie zu quantifizieren, wurde das nasse Herzgewicht der Versuchstiere auf die Tibialänge normiert. Für die statistische Analyse des Herzgewicht/Tibialänge- Verhältnisses (HG/TL) wurden folgende Faktoren herangezogen: Die Art des Eingriffes (also entweder Sham, 3-Wochen-alte TAC oder 6-Wochen-alte TAC) sowie die Behandlung der Versuchstiere (mit oder ohne Spermidin). Es wurde eine 2-Wege-Anova mit beiden Faktoren durchgeführt.

Die Annahmen der ANOVA-Analyse, wie Normalverteilungsannahme ($P = 0,681$) sowie die Annahme der homogenen Varianzen ($P = 0,315$) wurden geprüft (Levine's Test).

Anschließend wurden multiple paarweise Vergleiche angestellt: Die jeweiligen Vergleichsgruppen waren:

- Sham ohne Spermidin vs. Sham mit Spermidin
- 3 Wochen post-TAC (3-Wochen TAC) mit Spermidin vs. 3 Wochen post-TAC ohne Spermidin
- 6 Wochen post-TAC (6-Wochen TAC) mit Spermidin vs. 6 Wochen post-TAC ohne Spermidin
- Sham ohne Spermidin vs. 3 Wochen post-TAC ohne Spermidin
- Sham ohne Spermidin vs. 6 Wochen post-TAC ohne Spermidin
- 3 Wochen post-TAC ohne Spermidin vs. 6 Wochen post-TAC mit Spermidin
- Sham mit Spermidin vs. 3 Wochen post-TAC mit Spermidin
- Sham mit Spermidin vs. 6 Wochen post-TAC mit Spermidin
- 3 Wochen post-TAC mit Spermidin vs. 6 W post-TAC mit Spermidin

Für diese multiplen paarweisen Vergleiche wurde mit der Bonferroni-Methode für die α -Kumulierung kontrolliert. D.h. insgesamt wurden 9 Tests durchgeführt und somit wurde jeder einzelne P-Wert folgendermaßen adjustiert:

$$P_i \text{ adjusted} = P \text{ unadjusted} \times 9 \quad \text{für } i = 1, 2, \dots, 9$$

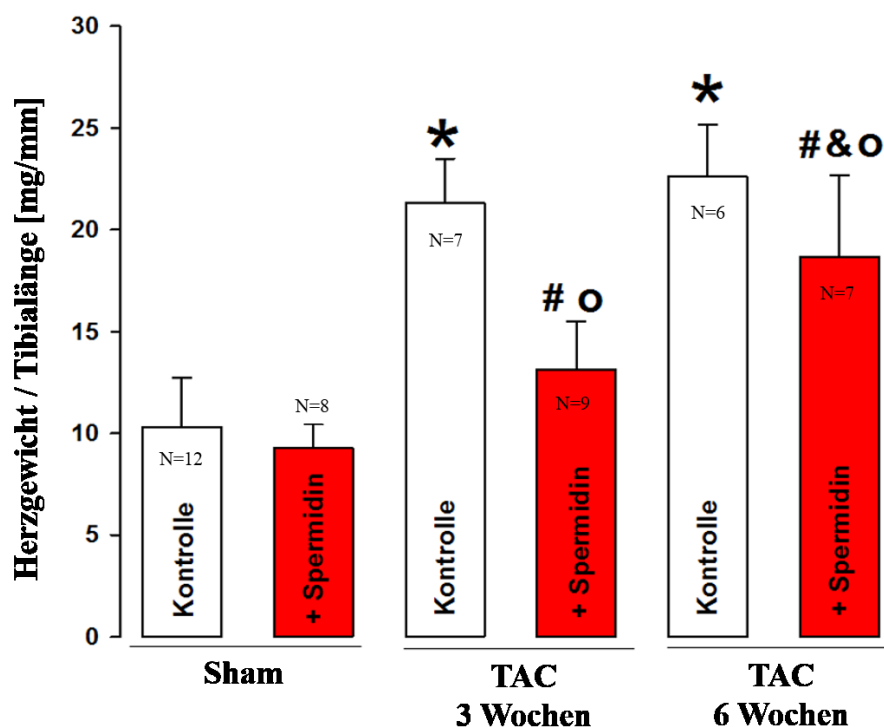


Abbildung 11: Analyse des Herzgewicht-Tibialänge-Verhältnisses. Die Balken zeigen Mittelwerte mit Standardfehler. Kontrolle = ohne Spermidin. * $P < 0.05$ versus Sham Gruppe OHNE Spermidin; # $P < 0.05$ versus Sham Gruppe MIT Spermidin; ° $P < 0.05$ versus jeweilige Kontrollgruppe; & $P < 0.05$ versus TAC 3 Wochen MIT Spermidin; in den Balken ist die jeweilige Anzahl der Versuchstiere in der entsprechenden Versuchsgruppe angegeben.

Abbildung 11 zeigte die grafische Darstellung der Messergebnisse. Beim Vergleich zwischen sämtlichen TAC-Gruppen und den Sham Gruppen zeigte sich ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der HG/TL-Verhältnisse. Alle TAC-Gruppen hatten signifikant höhere HG/TL-Werte als die Sham-Gruppen, was für eine Hypertrophie spricht. Es bestand kein Unterschied im HG/TL zwischen spermidinbehandelten Sham-Tieren und

Kontrolltieren. Der Vergleich der beiden 3 Wochen post-TAC-Gruppen, sowie der Vergleich der beiden 6 Wochen post-TAC-Gruppen zeigte ein signifikant niedrigere HG/TL-Verhältnis bei spermidinbehandelten Tieren. Insgesamt zeigte sich jedoch auch eine signifikante Reduzierung des Spermidineffekts nach 6 Wochen, so war die Differenz hinsichtlich des HG/TL-Verhältnisses innerhalb der 3W-TAC-Gruppen größer als jene der 6 Wochen post-TAC-Gruppen.

4.2 Histologische Analyse

4.2.1 Querschnittsfläche der Kardiomyozyten

Für die Analyse der Querschnittsflächen der Kardiomyozyten wurden erneut oben genannte Faktoren (Eingriff und Behandlung) herangezogen und eine 2-Wege-ANOVA durchgeführt.

Normalverteilungsannahme ($P = 0,065$) sowie die Annahme der homogenen Varianzen ($P = 0,164$) wurden geprüft und waren gegeben (Levine's Test). Als post-hoc Test wurde der Bonferroni-Test verwendet.

Der Faktor „Eingriff“ zeigte einen signifikanten Unterschied ($P < 0.001$) im Vergleich von sämtlichen TAC-Gruppen zu den Sham-Gruppen. Alle TAC-Gruppen zeigten deutlich höhere Werte (somit mehr Hypertrophie der Kardiomyozyten) als Sham-Mäuse. Beim Vergleich der beiden 3W-TAC-Gruppen (mit Spermidin vs. ohne Spermidin) sowie der beiden 6W-TAC-Gruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied, wobei mit einem P -Wert von 0,056 der Unterschied zwischen den beiden 6W-TAC-Gruppen von einem Trend zur Signifikanz gesprochen werden kann. Abbildung 12 zeigt Ausschnitte aus für die jeweilige Versuchsgruppe typischen Aufnahmen mit dem Fluoreszenzmikroskop, Abbildung 13 gibt eine grafische Darstellung der Ergebnisse mittels Balkendiagramm.

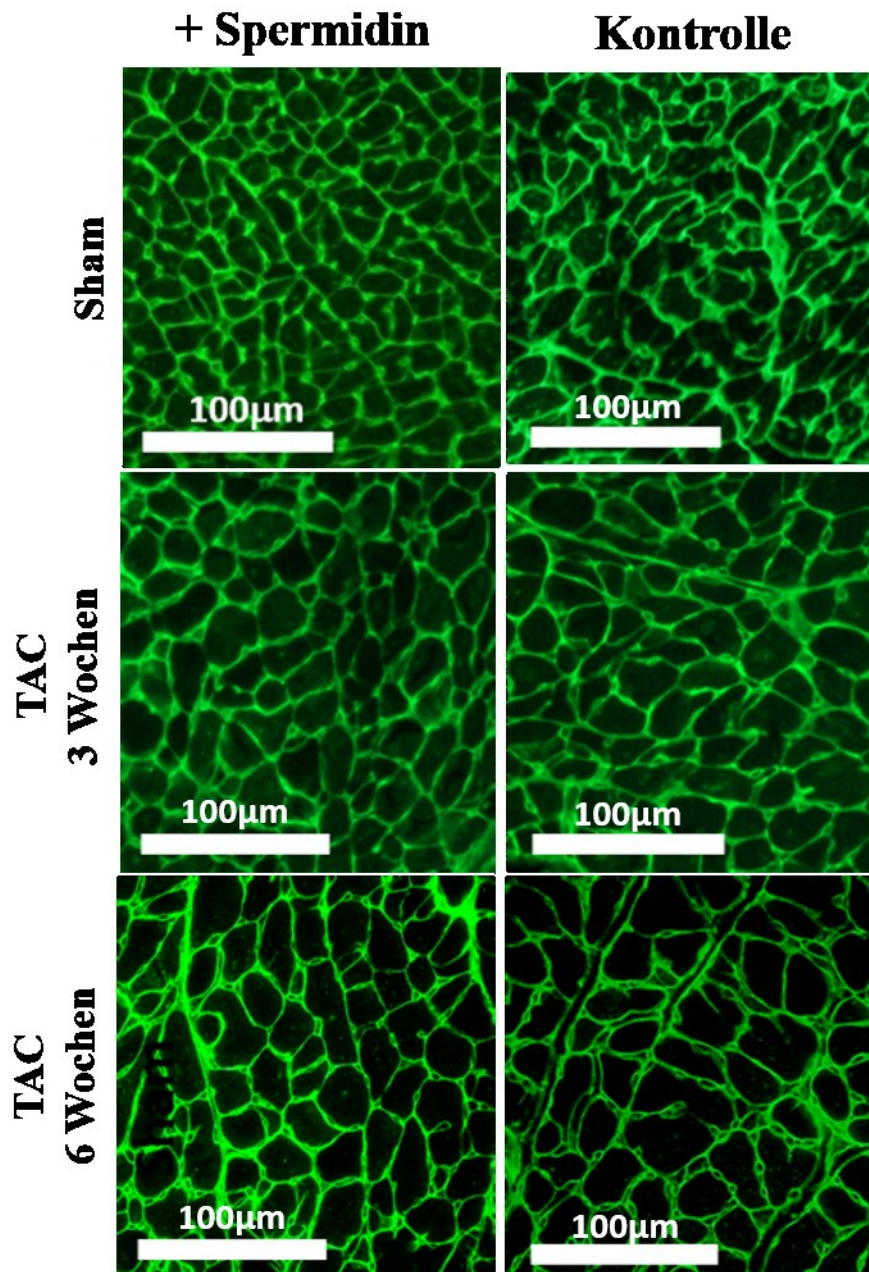


Abbildung 12: WGA-Färbung. Typische Beispiele der Aufnahmen von den mit WGA behandelten Herzschnitten (40-fache Vergrößerung). In grün ist die extrazelluläre Matrix dargestellt.

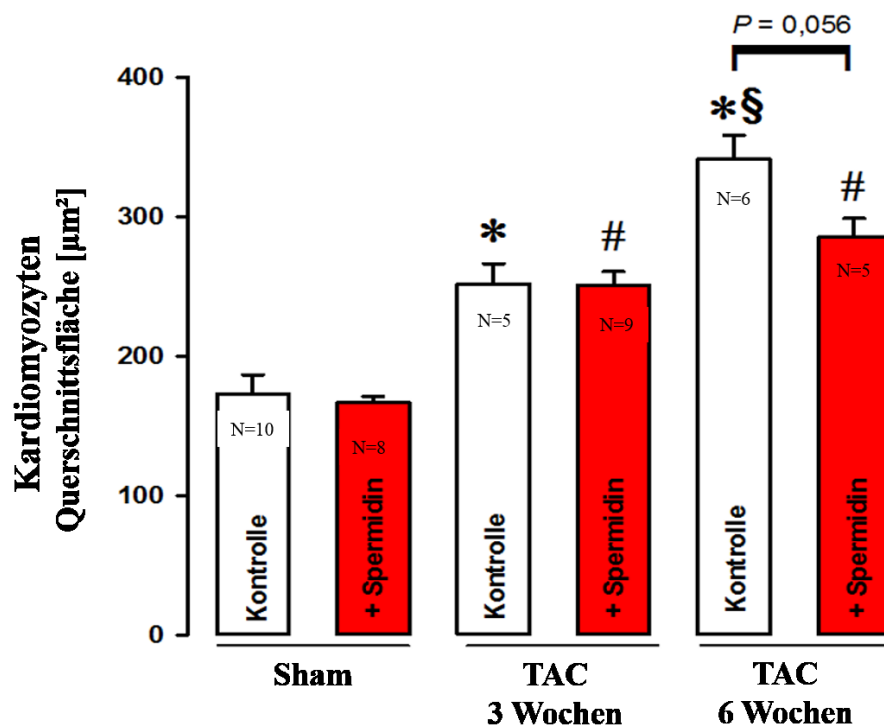


Abbildung 13: Kardiomyozyten-Querschnittsfläche. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte mit Standardfehler der jeweiligen Gruppen. Pro Herz (pro Versuchstier) wurden im Durchschnitt 900 bis 1500 Zellen analysiert. * $P < 0.05$ versus Sham-Gruppe OHNE Spermidin; # $P < 0.05$ versus Sham-Gruppe + Spermidin; § $P < 0.05$ versus TAC 3 Wochen OHNE Spermidin; Kontrolle = ohne Spermidinbehandlung; in den Balken ist die jeweilige Anzahl der Versuchstiere der entsprechenden Versuchsgruppe angegeben.

4.2.2 Kollagenanalyse

Für die Analyse des Kollagengehalts (Abbildung 14 und 15) wurden selbige Faktoren (Eingriff und Behandlung) wie oben herangezogen und eine 2-Wege-ANOVA mit diesen beiden Faktoren durchgeführt.

Normalverteilung ($P < 0,050$) sowie Homogenität der Varianz ($P < 0,050$) wurden geprüft. Die Annahmen waren nicht gegeben (Levine's Test); daher wurde die Analyse anschließend nichtparametrisch durchgeführt, wobei hier die Software SAS (Statistical Analysis System, SAS Institute Inc., USA) verwendet wurde. Als post-hoc Test wurde der Bonferroni-Test verwendet (p-Adjustment).

Die Vergleiche der Gruppen hinsichtlich des Faktors „Eingriff“ zeigte einen signifikanten Unterschied im Kollagengehalt ($P < 0,001$). Mäuse, die einer TAC-Operation unterzogen worden waren zeigten deutlich höhere Kollagenwerte als Sham-Mäuse. Die Interaktion der

beiden Faktoren Eingriff und Behandlung zeigte nach 3 sowie 6 Wochen keine Signifikanz, das heißt das es keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich des Kollagengehalts zwischen spermidinbehandelten und unbehandelten Mäusen gab.

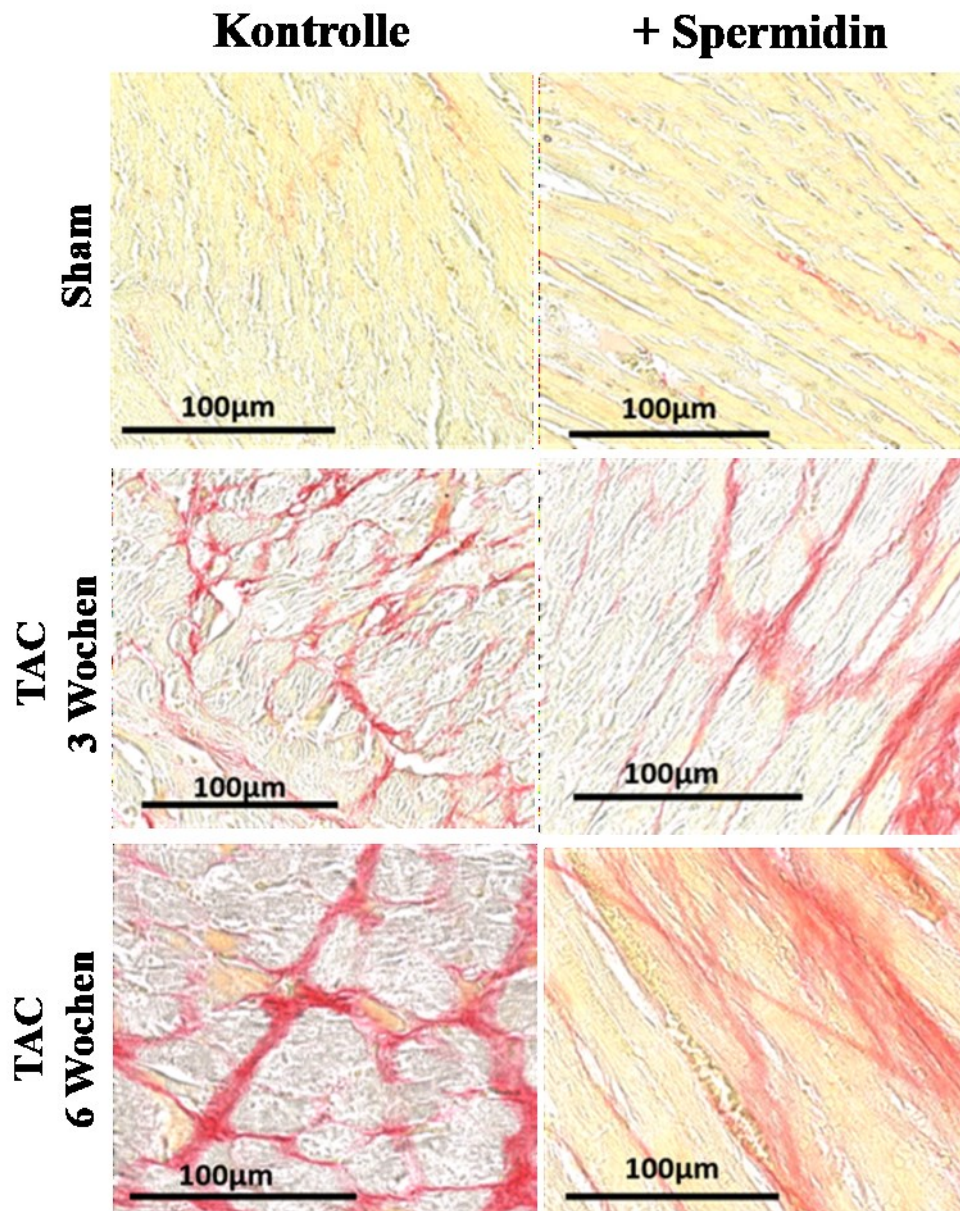


Abbildung 14: Pikrosirius (PSR) Färbung. Ausschnitte aus mit PSR gefärbten Herzschnitten, die als Beispiele für den jeweiligen Durchschnittswert an Kollagen (hier in Rot) einer Versuchsgruppe dienen sollen.

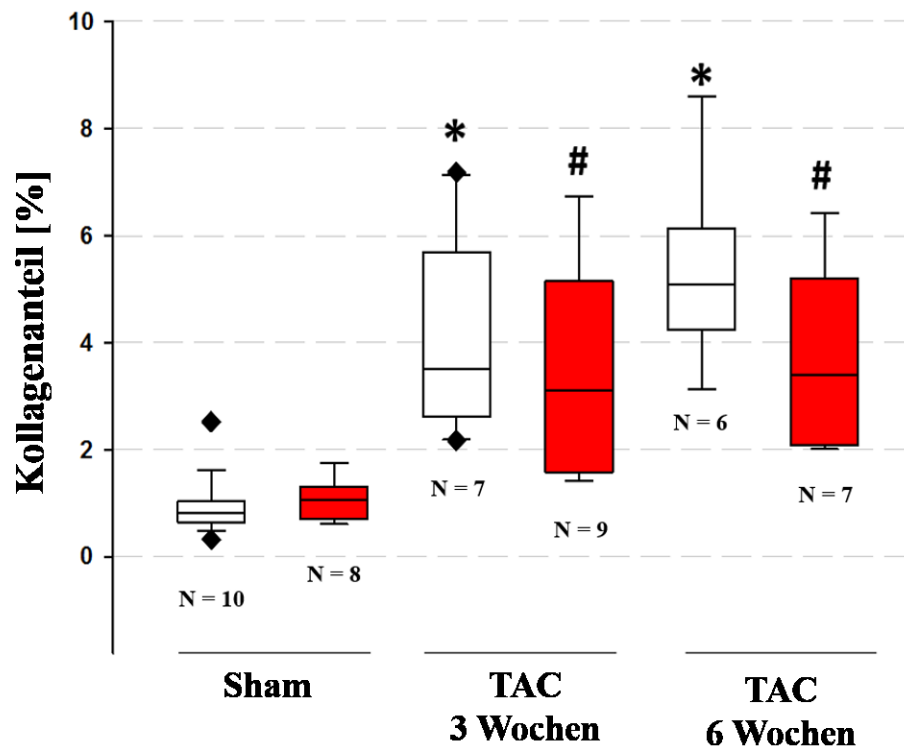


Abbildung 15: Mittelwerte und Häufigkeitsverteilungen des Kollagenanteils der jeweiligen Versuchsgruppen. Darstellung der Ergebnisse aus der Kollagenanalyse mittels Box-Plot-Diagramm. Die Striche in der Mitte stellen den Mittelwert der einzelnen Gruppen dar, die Boxgrenzen das 25-75%-Perzentil und die Querbalken oben und unten die jeweiligen Extremwerte. Ausreißer sind mittels (◆) dargestellt. * $P < 0.001$ versus Sham-Gruppe OHNE Spermidin; # $P < 0.001$ versus Sham-Gruppe + Spermidin; Weiße Boxen = ohne Spermidinbehandlung (Kontrolle), rote Boxen = spermidinbehandelte Mäuse. Unter den Boxen ist die jeweilige Anzahl der Versuchstiere in den entsprechenden Versuchsgruppen angegeben.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte von Spermidin auf das unter erhöhter Drucklast stehende Herz untersucht. Die Ergebnisse der histologischen Analyse zeigten in unserem Falle nach 6 Wochen einen Trend zum signifikanten Unterschied in der Ausprägung der Hypertrophie zwischen spermidinbehandelten und Kontroll-TAC-Mäusen. Dieses Ergebnis bestätigt die vorhergehenden gravimetrischen Analysen, die weniger Herzgewicht bei spermidinbehandelten Mäusen als bei unbehandelten Kontrolltieren 6 Wochen nach TAC ergaben. Echokardiografische Messungen, u.a. der Auswurfsfraktion, zeigten nach 6 Wochen eine deutliche bessere kardiale Funktion bei spermidinbehandelten Mäusen (Sedej et al., nicht publizierte Daten). Die Diskrepanz zwischen der Analyse der Querschnittsfläche der Kardiomyozyten und der Analyse des HG/TL-Verhältnisses, welche sich bei den 3-Wochen-alten TAC-Mäusen zeigte, könnte durch ein stereologisches Problem erklärbar sein. Gemeint damit ist eine eventuelle Verfälschung von Ergebnissen durch die dreidimensionale Interpretation von zweidimensionalen Schnittbildern (33).

Kardioprotektive Effekte von Spermidin. Ein wesentlicher Effekt von Spermidin ist die Beeinflussung der NO-Synthase, wobei die genauen Signalmechanismen hier noch nicht gänzlich verstanden sind: Spermidin galt lange als Hemmer der NO-Synthase (88,89), jedoch zeigten Forschungsergebnisse auch einen stimulierenden Effekt von Spermidin auf die NO-Synthase, zum Beispiel im Hippocampus von Ratten (90). Die Komplexität der Einflussnahme von Spermidin auf die Aktivität der NO-Synthase könnte sich in den unterschiedlichen Wirkmechanismen, die NO selbst auf das Herz hat, widerspiegeln. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, beeinflusst NO die Kontraktilität des Herzens, und zwar in einer dosisabhängigen Weise. Niedrige Dosen von NO wirken positiv inotrop (also kontraktilitätssteigernd) während hohe Dosen einen negativ inotropen Effekt auf das Myokard haben (97). Nach TAC findet im Herzen eine Hochregulierung der i-NOS statt, die im Zusammenhang mit kardialer Hypertrophie, Dilatation und schlussendlich Herzversagen stehen soll (98). Unsere Ergebnisse zeigen, dass sich bei spermidinbehandelten Herzen nach TAC weniger Hypertrophie finden lässt. Zusammen mit den echokardiografischen Messergebnissen von Sedej et al. (nicht publizierte Daten) könnten diese Ergebnisse auf eine vermehrte Aktivierung der NOS, mehr NO-Verfügbarkeit oder mehr Autophagie durch

Spermidin zurückzuführen sein. Im Unterschied dazu zeigen Mäuse mit einer Überexpression der neuronalen NOS in Kardiomyozyten nach TAC nicht nur bessere kontraktile Eigenschaften sondern auch eine verminderte Dilatation als Kontrollmäuse (99), Ergebnisse die mit unseren Echodaten konform gehen und durch eine Stimulation der NOS durch Spermidin erklärbar wären. In Arterien erhöht Spermidin unter anderem die NO-Bioverfügbarkeit und vermag dadurch, altersbedingte, degenerative Veränderungen im kardiovaskulären System günstig zu beeinflussen. Diese protektiven Eigenschaften von Spermidin im Zusammenhang mit NO sind mitunter auf eine Stimulation von Autophagie zurückzuführen (100). Generell gilt Spermidin als Stimulator der Autophagie (101). In Hefe, Fruchtfliegen, Nematoden sowie menschlichen Immunzellen führt Spermidin zu einer verlängerten Lebensspanne und seine lebensverlängernden Effekte werden über Autophagie vermittelt. Dasselbe gilt für antioxidative Effekte, die Spermidin bei Fruchtfliegen zeigt (84). Morselli et al. (2011) waren die ersten, die einen stimulierenden Effekt von Spermidin auf die Autophagie im Herzen nachgewiesen haben. Die Ergebnisse ihrer Studie besagten, dass eine einmalige hohe Dosis von Spermidin Autophagie im Herzen (aber auch in anderen Organen wie Leber oder Muskelgewebe) signifikant steigern kann (102).

Autophagie ist ein zelleigener Abbaumechanismus von Zytoplasmabestandteilen. Sie dient der Proteinqualitätskontrolle und fungiert gleichzeitig als ein Recycling-Mechanismus um zelluläre Energielevel in Perioden der Nahrungskarenz aufrecht zu erhalten (103). Im Herzen herrscht unter Normalbedingungen stets ein basaler Level an Autophagie, der für den Zellstoffwechsel und das Überleben der Kardiomyozyten unverzichtbar ist (104,105). Wird das Herz vermehrter Drucklast ausgesetzt, kommt es zu einem starken Anstieg der Autophagie-Aktivität in Herzmuskelzellen (70,106). Nach wie vor ist umstritten, ob Autophagie im druckbelasteten Herz protektiv oder maladaptiv wirkt, oder, anders gesehen, welches Maß an Autophagie noch protektiv wirkt und ab welchem Maß es schädlich für das Herz ist (107). Unter Normbedingungen dient die im Herzen stattfindende Autophagie dem Erhalt der Funktionstüchtigkeit von Kardiomyozyten, im Gegenzug führt eine Hemmung von Autophagie zu kardialer Dysfunktion (108). Kommt es jedoch unter Normbedingungen zu einer Überstimulation von Autophagie, kann auch dies Zellschädigungen und Zelluntergang zur Folge haben, u.a. durch eine exzessive Auslese von Mitochondrien und den daraus resultierenden Energiemangel der Zellen (109). Spermidin induziert auch im Herzen Autophagie (102). Welche genauen Effekte durch Spermidin im Herzen nach TAC

erzielt werden und welche Effekte auf eine Stimulation von Autophagie durch Spermidin zurückzuführen sind, muss aber noch weiter geklärt werden.

Spermidin und andere Modulatoren der Autophagie. Um mehr über die Effekte der Autophagie herauszufinden, wurden weitere Modulatoren dieser genauer untersucht. Zu den Wirkstoffen, die Autophagie im Herzen nachweislich stimulieren, gehören neben Spermidin unter anderem noch Rapamycin sowie Resveratrol. Das potente Immunsuppressivum Rapamycin, das bei Patienten nach Transplantation postoperativ zur Vermeidung einer Organabstoßung zum Einsatz kommt, zeigte, wie Spermidin, lebensverlängernde Eigenschaften. Bei Mäusen konnte es die maximale Lebenserwartung um 9 bis 13% steigern (110). Rapamycin hemmt mTOR (Engl. „mammalian target of rapamycin“), eine Serin/Threonin-Kinase die Zellwachstum und –stoffwechsel entsprechend den jeweiligen Umweltbedingungen reguliert. Durch die Hemmung von mTOR stimuliert Rapamycin die Autophagie (111,112). Mäuse, die nach TAC über einen Zeitraum von 4 Wochen mit Rapamycin behandelt wurden, zeigten signifikant weniger Hypertrophie sowie deutlich weniger interstitielle Fibrose als Kontrollmäuse, ohne jedoch unter schweren Nebenwirkungen der Therapie mit Rapamycin zu leiden. Die Therapie mit Rapamycin führte unter anderem zu einer deutlichen Hemmung des mTOR-Signalweges, was auf eine starke Beteiligung von mTOR bei der Entwicklung einer Hypertrophie schließen lässt (113). Andere Studien bestätigen die positiven Effekte von Rapamycin auf ein kardiales Remodeling nach Aortenkonstriktion in Mäusen (114,115). Dass mTOR ein elementares Signalmolekül in der Reizantwort des Myokards auf vermehrten hämodynamischen Stress ist, zeigten Studienergebnisse von Zhang et al. (2010). mTOR-knockout Mäuse zeigten hier nach TAC verminderte Hypertrophie und ein deutlich schnelleres Auftreten von Herzinsuffizienz (116). Die kontroversen Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass die verschiedenen Unterarten von mTOR an verschiedenen Signalwegen im Herzen teilhaben, eine generelle Blockierung von mTOR jedoch verheerende Konsequenzen für das Herz hat. Ob und wenn ja, inwieweit Autophagie in die Reizantwort des Myokards unter chronischer Drucklast involviert ist, muss noch genauer erörtert werden. Sicher ist jedoch, dass das Konzept einer nahrungsbedingten Prävention von kardiovaskulären Erkrankungen über Autophagie, wie es durch Spermidin möglich wäre, gegenüber einer Therapie mit potentiell zelltoxischen Substanzen (wie Rapamycin) zu favorisieren wäre. Ein weiterer potentieller Anreger der Autophagie ist Resveratrol, ein Phytoalexin, das vor allem durch sein Vorkommen in roten Weintrauben an Bekanntheit gewonnen hat (117,118). Resveratrol ist bekannt für seine protektiven Effekte auf das kardiovaskuläre System: U.a. beeinflusst es

den Lipidstoffwechsel positiv, führt über die Anregung der NO-Synthese zu vermehrter Vasorelaxation und reduziert oxidativen sowie inflammatorischen Stress (119,120). Eine Stimulation von Autophagie im Herzen resultiert aus einer jeweiligen parenteralen Applikation einer Hochdosis von Spermidin oder Resveratrol, sowie einer Kombination der beiden Wirkstoffe (102). Während Resveratrol über Sirtuin-1 Autophagie stimuliert, ist eine Stimulierung von Autophagie durch Spermidin unabhängig von diesem für die Signaltransduktion wichtigen Protein (102).

Offene Fragen und klinischer Ausblick. Erhöhte Drucklast, wie sie etwa bei chronischen Bluthochdruck vorkommt, führt über die Reaktivierung eines embryonalen Genprogramms und vielen verschiedenen Signalkaskaden zu einem kardialen Remodeling, welches durch Hypertrophie und vermehrter Apoptose von Kardiomyozyten, der Entwicklung einer interstitiellen Fibrose, einer Rarifizierung der Mikrozirkulation u.v.m. charakterisiert ist (5,121,122).

In der vorliegenden Arbeit bleibt die Frage, über welche Mechanismen Spermidin zu einer Reduktion der Hypertrophie geführt hat, offen. Es ist verständlich, dass eine Hypertrophie durch einen starken und akut eintretenden Stimulus wie es eine Aortenkonstriktion ist, nicht gänzlich aufzuhalten ist. Interessant wären daher weitere Untersuchungen der Effekte von Spermidin in einem weniger starken, dafür chronischen, Modell der erhöhten Drucklast (z.B. in Dahl Salz-sensitiven Ratten). Ein experimentelles Design, das die Umstände eines chronischen Hypertonus simuliert, könnte hier ein vielversprechender (und praxisrelevanter) Ansatz sein. Dasselbe gilt für die Untersuchung des Ausmaßes an Fibrose. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen im Falle dieser Arbeit keinen Unterschied zwischen der spermidinbehandelten Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe. Im Gegensatz zeigt eine Behandlung mit Rapamycin, die nach TAC erfolgt, eine deutliche Reduktion des interstitiellen Kollagengehalts (113). Daher wäre es interessant, die Effekte von Spermidin zu untersuchen, wenn es therapeutisch anstatt präventiv, also erst nach TAC, verabreicht wird.

Die Therapie der Herzinsuffizienz fokussiert derzeit hauptsächlich auf die klinischen Auswirkungen einer bereits stattgehabten Herzmuskelschädigung. Daher sind Wirkstoffe, die auf molekularer Ebene angreifen und das Remodeling des Herzens direkt beeinflussen, von höchstem Interesse. Spermidin zeigt bereits vielversprechende Ergebnisse als kardioprotektiver Wirkstoff. Weitere Forschung muss zeigen, über welche Mechanismen es

agiert, bzw. zu welchem Maß und unter welche Bedingungen es seine protektiven Effekte zeigt.

6 Literaturverzeichnis

1. Fuster V, Voute J, Hunn M, Smith SC. Low Priority of Cardiovascular and Chronic Diseases on the Global Health Agenda: A Cause for Concern. *Circulation*. 8. Oktober 2007;116(17):1966–70.
2. Stewart S, MacIntyre K, Hole DJ, Capewell S, McMurray JJ. More „malignant“ than cancer? Five-year survival following a first admission for heart failure. *Eur J Heart Fail*. Juni 2001;3(3):315–22.
3. Meta-analysis Global Group in Chronic Heart Failure (MAGGIC). The survival of patients with heart failure with preserved or reduced left ventricular ejection fraction: an individual patient data meta-analysis. *Eur Heart J*. Juli 2012;33(14):1750–7.
4. Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, u. a. ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): developed in collaboration with the American College of Chest Physicians and the International Society for Heart and Lung Transplantation: endorsed by the Heart Rhythm Society. *Circulation*. 20. September 2005;112(12):e154–235.
5. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling—concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *J Am Coll Cardiol*. März 2000;35(3):569–82.
6. Díez J, Frohlich ED. A Translational Approach to Hypertensive Heart Disease. *Hypertension*. 1. Januar 2010;55(1):1–8.
7. Drazner MH. The Progression of Hypertensive Heart Disease. *Circulation*. 25. Januar 2011;123(3):327–34.
8. Chambers J. The left ventricle in aortic stenosis: evidence for the use of ACE inhibitors. *Heart*. 1. März 2006;92(3):420–3.
9. Olszowska M. Pathogenesis and pathophysiology of aortic valve stenosis in adults. *Pol Arch Med Wewnętrznej*. November 2011;121(11):409–13.
10. Nikolova A, Ablasser K, Wyler von Ballmoos MC, Poutias D, Kaza E, McGowan FX, u. a. Endogenous angiogenesis inhibitors prevent adaptive capillary growth in left ventricular pressure overload hypertrophy. *Ann Thorac Surg*. November 2012;94(5):1509–17.
11. Miner EC, Miller WL. A look between the cardiomyocytes: the extracellular matrix in heart failure. *Mayo Clin Proc Mayo Clin*. Januar 2006;81(1):71–6.
12. Eckhouse SR, Spinale FG. Changes in the myocardial interstitium and contribution to the progression of heart failure. *Heart Fail Clin*. Januar 2012;8(1):7–20.

13. Hutchinson KR, Stewart JA Jr, Lucchesi PA. Extracellular matrix remodeling during the progression of volume overload-induced heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* März 2010;48(3):564–9.
14. Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, u. a. Apoptosis in the Failing Human Heart. *N Engl J Med.* 17. April 1997;336(16):1131–41.
15. Sun Y. Myocardial repair/remodelling following infarction: roles of local factors. *Cardiovasc Res.* 29. Oktober 2008;81(3):482–90.
16. Petrovic D. Cytopathological basis of heart failure--cardiomyocyte apoptosis, interstitial fibrosis and inflammatory cell response. *Folia Biol (Praha).* 2004;50(2):58–62.
17. Kuwahara K, Nishikimi T, Nakao K. Transcriptional regulation of the fetal cardiac gene program. *J Pharmacol Sci.* 2012;119(3):198–203.
18. Harvey PA, Leinwand LA. The cell biology of disease: Cellular mechanisms of cardiomyopathy. *J Cell Biol.* 8. August 2011;194(3):355–65.
19. Krumholz HM, Larson M, Levy D. Prognosis of left ventricular geometric patterns in the Framingham heart study. *J Am Coll Cardiol.* 15. März 1995;25(4):879–84.
20. Ganau A, Devereux RB, Roman MJ, de Simone G, Pickering TG, Saba PS, u. a. Patterns of left ventricular hypertrophy and geometric remodeling in essential hypertension. *J Am Coll Cardiol.* Juni 1992;19(7):1550–8.
21. Lorell BH, Carabello BA. Left Ventricular Hypertrophy: Pathogenesis, Detection, and Prognosis. *Circulation.* 25. Juli 2000;102(4):470–9.
22. Carabello BA. Concentric versus eccentric remodeling. *J Card Fail.* Dezember 2002;8(6 Suppl):S258–263.
23. Zile MR, Bennett TD, St. John Sutton M, Cho YK, Adamson PB, Aaron MF, u. a. Transition From Chronic Compensated to Acute Decompensated Heart Failure: Pathophysiological Insights Obtained From Continuous Monitoring of Intracardiac Pressures. *Circulation.* 30. September 2008;118(14):1433–41.
24. Diwan A, Dorn GW. Decompensation of Cardiac Hypertrophy: Cellular Mechanisms and Novel Therapeutic Targets. *Physiology.* 1. Februar 2007;22(1):56–64.
25. VLIEGEN HW, VAN DER LAARSE A, CORNELISSE CJ, EULDERINK F. Myocardial changes in pressure overload-induced left ventricular hypertrophy: A study on tissue composition, polyploidization and multinucleation. *Eur Heart J.* 1. April 1991;12(4):488–94.
26. Nag AC. Study of non-muscle cells of the adult mammalian heart: a fine structural analysis and distribution. *Cytobios.* 1980;28(109):41–61.
27. Ichihara S, Senbonmatsu T, Price E, Ichiki T, Gaffney FA, Inagami T. Angiotensin II Type 2 Receptor Is Essential for Left Ventricular Hypertrophy and Cardiac Fibrosis in Chronic Angiotensin II-Induced Hypertension. *Circulation.* 17. Juli 2001;104(3):346–51.

28. Baudino TA, Carver W, Giles W, Borg TK. Cardiac fibroblasts: friend or foe? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. September 2006;291(3):H1015–1026.
29. Fan D, Takawale A, Lee J, Kassiri Z. Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2012;5(1):15.
30. Ma F, Li Y, Jia L, Han Y, Cheng J, Li H, u. a. Macrophage-stimulated cardiac fibroblast production of IL-6 is essential for TGF β /Smad activation and cardiac fibrosis induced by angiotensin II. *PloS One*. 2012;7(5):e35144.
31. Cuspidi C, Ciulla M, Zanchetti A. Hypertensive myocardial fibrosis. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. Januar 2006;21(1):20–3.
32. Mosterd A, Hoes AW, de Bruyne MC, Deckers JW, Linker DT, Hofman A, u. a. Prevalence of heart failure and left ventricular dysfunction in the general population; The Rotterdam Study. *Eur Heart J*. 1. März 1999;20(6):447–55.
33. Mühlfeld C, Schipke J, Schmidt A, Post H, Pieske B, Sedej S. Hypoinnervation is an early event in experimental myocardial remodelling induced by pressure overload. *J Anat*. Juni 2013;222(6):634–44.
34. Wenzel RR, Siffert W, Bruck H, Philipp T, Schäfers RF. Enhanced vasoconstriction to endothelin-1, angiotensin II and noradrenaline in carriers of the GNB3 825T allele in the skin microcirculation. *Pharmacogenetics*. August 2002;12(6):489–95.
35. Antonios TF, Singer DR, Markandu ND, Mortimer PS, MacGregor GA. Structural skin capillary rarefaction in essential hypertension. *Hypertension*. April 1999;33(4):998–1001.
36. Renna NF, de Las Heras N, Miatello RM. Pathophysiology of vascular remodeling in hypertension. *Int J Hypertens*. 2013;2013:808353.
37. Flanagan MF, Fujii AM, Colan SD, Flanagan RG, Lock JE. Myocardial angiogenesis and coronary perfusion in left ventricular pressure-overload hypertrophy in the young lamb. Evidence for inhibition with chronic protamine administration. *Circ Res*. Mai 1991;68(5):1458–70.
38. Lindstedt IH, Edvinsson M-L, Edvinsson L. Reduced responsiveness of cutaneous microcirculation in essential hypertension--a pilot study. *Blood Press*. 2006;15(5):275–80.
39. Schwartzkopff B, Strauer BE. Squeezing tubes: a case of remodeling and regulation: coronary reserve in hypertensive heart disease. *Cardiovasc Res*. Oktober 1998;40(1):4–8.
40. Kinugawa S, Post H, Kaminski PM, Zhang X, Xu X, Huang H, u. a. Coronary microvascular endothelial stunning after acute pressure overload in the conscious dog is caused by oxidant processes: the role of angiotensin II type 1 receptor and NAD(P)H oxidase. *Circulation*. 9. Dezember 2003;108(23):2934–40.

41. Dorn GW 2nd. Apoptotic and non-apoptotic programmed cardiomyocyte death in ventricular remodelling. *Cardiovasc Res.* 15. Februar 2009;81(3):465–73.
42. Condorelli G, Morisco C, Stassi G, Notte A, Farina F, Sgaramella G, u. a. Increased cardiomyocyte apoptosis and changes in proapoptotic and antiapoptotic genes bax and bcl-2 during left ventricular adaptations to chronic pressure overload in the rat. *Circulation.* 15. Juni 1999;99(23):3071–8.
43. Vanempel V, Bertrand A, Hofstra L, Crijns H, Doevendans P, Dewindt L. Myocyte apoptosis in heart failure. *Cardiovasc Res.* 1. Juli 2005;67(1):21–9.
44. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* Juni 2007;35(4):495–516.
45. Kang PM, Izumo S. Apoptosis and Heart Failure : A Critical Review of the Literature. *Circ Res.* 9. Juni 2000;86(11):1107–13.
46. Narula J, Haider N, Virmani R, DiSalvo TG, Kolodgie FD, Hajjar RJ, u. a. Apoptosis in Myocytes in End-Stage Heart Failure. *N Engl J Med.* 1996;335(16):1182–9.
47. Vanlangenakker N, Berghe T, Krysko D, Festjens N, Vandenameele P. Molecular Mechanisms and Pathophysiology of Necrotic Cell Death. *Curr Mol Med.* 1. Mai 2008;8(3):207–20.
48. Yang Z, Klionsky DJ. An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2009;335:1–32.
49. Mizushima N, Ohsumi Y, Yoshimori T. Autophagosome Formation in Mammalian Cells. *Cell Struct Funct.* 2002;27(6):421–9.
50. Ravikumar B, Futter M, Jahreiss L, Korolchuk VI, Lichtenberg M, Luo S, u. a. Mammalian macroautophagy at a glance. *J Cell Sci.* 20. Mai 2009;122(11):1707–11.
51. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell.* 11. Januar 2008;132(1):27–42.
52. Wei Y, Pattingre S, Sinha S, Bassik M, Levine B. JNK1-Mediated Phosphorylation of Bcl-2 Regulates Starvation-Induced Autophagy. *Mol Cell.* 20. Juni 2008;30(6):678–88.
53. Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, Lindsten T, u. a. Growth Factor Regulation of Autophagy and Cell Survival in the Absence of Apoptosis. *Cell.* 28. Januar 2005;120(2):237–48.
54. Kouroku Y, Fujita E, Tanida I, Ueno T, Isoai A, Kumagai H, u. a. ER stress (PERK/eIF2 α phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell Death Differ.* 23. Juni 2006;14(2):230–9.
55. English L, Chemali M, Duron J, Rondeau C, Laplante A, Gingras D, u. a. Autophagy enhances the presentation of endogenous viral antigens on MHC class I molecules during HSV-1 infection. *Nat Immunol.* 22. März 2009;10(5):480–7.

56. Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, Taylor GA, Colombo MI, Deretic V. Autophagy Is a Defense Mechanism Inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis Survival in Infected Macrophages. *Cell*. 17. Dezember 2004;119(6):753–66.
57. Lee HK, Lund JM, Ramanathan B, Mizushima N, Iwasaki A. Autophagy-Dependent Viral Recognition by Plasmacytoid Dendritic Cells. *Science*. 9. März 2007;315(5817):1398–401.
58. Kiffin R, Bandyopadhyay U, Cuervo AM. Oxidative Stress and Autophagy. *Antioxid Redox Signal*. Januar 2006;8(1-2):152–62.
59. Keller JN, Dimayuga E, Chen Q, Thorpe J, Gee J, Ding Q. Autophagy, proteasomes, lipofuscin, and oxidative stress in the aging brain. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(12):2376–91.
60. Dewaele M, Maes H, Agostinis P. ROS-mediated mechanisms of autophagy stimulation and their relevance in cancer therapy. *Autophagy*. 1. Oktober 2010;6(7):838–54.
61. He C, Bassik MC, Moresi V, Sun K, Wei Y, Zou Z, u. a. Exercise-induced BCL2-regulated autophagy is required for muscle glucose homeostasis. *Nature*. 18. Januar 2012;481(7382):511–5.
62. Jing K, Lim K. Why is autophagy important in human diseases? *Exp Mol Med*. 29. Februar 2012;44(2):69–72.
63. He L, Lu J, Yue Z. Autophagy in ageing and ageing-associated diseases. *Acta Pharmacol Sin*. Mai 2013;34(5):605–11.
64. Wang Y, Qin Z. Coordination of autophagy with other cellular activities. *Acta Pharmacol Sin*. Mai 2013;34(5):585–94.
65. Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*. 1. Mai 2007;12(5):913–22.
66. Twig G, Elorza A, Molina AJA, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, u. a. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J*. 17. Januar 2008;27(2):433–46.
67. Gustafsson AB, Gottlieb RA. Recycle or die: the role of autophagy in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol*. April 2008;44(4):654–61.
68. Terman A, Brunk UT. Autophagy in cardiac myocyte homeostasis, aging, and pathology. *Cardiovasc Res*. 1. Dezember 2005;68(3):355–65.
69. Gottlieb RA, Finley KD, Mentzer RM Jr. Cardioprotection requires taking out the trash. *Basic Res Cardiol*. März 2009;104(2):169–80.
70. Zhu H, Tannous P, Johnstone JL, Kong Y, Shelton JM, Richardson JA, u. a. Cardiac autophagy is a maladaptive response to hemodynamic stress. *J Clin Invest*. Juli 2007;117(7):1782–93.

71. Rothermel BA, Hill JA. The heart of autophagy: deconstructing cardiac proteotoxicity. *Autophagy*. Oktober 2008;4(7):932–5.
72. Tabor CW, Tabor H. Polyamines. *Annu Rev Biochem*. Juni 1984;53(1):749–90.
73. Kalač P, Krausová P. A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods. *Food Chem*. März 2005;90(1–2):219–30.
74. Eliassen KA, Reistad R, Risøen U, Rønning HF. Dietary polyamines. *Food Chem*. August 2002;78(3):273–80.
75. Kalač P, Křížek M, Pelikánová T, Langová M, Veškrna O. Contents of polyamines in selected foods. *Food Chem*. Mai 2005;90(4):561–4.
76. Binh PNT. Mediterranean diet and polyamine intake—possible contribution of increased polyamine intake to inhibition of age-associated disease. 2011;
77. Milovic V. Polyamines in the gut lumen: bioavailability and biodistribution. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. September 2001;13(9):1021–5.
78. Abraham AK, Olsnes S, Pihl A. Fidelity of protein synthesis in vitro is increased in the presence of spermidine. *FEBS Lett*. Mai 1979;101(1):93–6.
79. Gerner EW, Mamont PS, Bernhardt A, Siat M. Post-translational modification of the protein-synthesis initiation factor eIF-4D by spermidine in rat hepatoma cells. *Biochem J*. 1986;239(2):379–86.
80. Hunter AR, Farrell PJ, Jackson RJ, Hunt T. The Role of Polyamines in Cell-Free Protein Synthesis in the Wheat-Germ System. *Eur J Biochem*. Mai 1977;75(1):149–57.
81. Thomas T, Thomas TJ. Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Mol Life Sci CMLS*. Februar 2001;58(2):244–58.
82. Childs AC, Mehta DJ, Gerner EW. Polyamine-dependent gene expression. *Cell Mol Life Sci CMLS*. Juli 2003;60(7):1394–406.
83. Binh PNT. Relationship between food polyamines and gross domestic product in association with longevity in Asian countries. *Health (N Y)*. 2010;02(12):1390–6.
84. Eisenberg T, Knauer H, Schauer A, Büttner S, Ruckstuhl C, Carmona-Gutierrez D, u. a. Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nat Cell Biol*. November 2009;11(11):1305–14.
85. Han L, Xu C, Jiang C, Li H, Zhang W, Zhao Y, u. a. Effects of polyamines on apoptosis induced by simulated ischemia/reperfusion injury in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Cell Biol Int*. 2007;31(11):1345–52.
86. STEFANELLI C, Stanic I, Zini M, Bonavita F, Flamigni F, Zambonin L, u. a. Polyamines directly induce release of cytochrome c from heart mitochondria. *Biochem J*. 2000;347:875–80.

87. Giordano E, Flamigni F, Guarnieri C, Muscari C, Pignatti C, Stefanelli C, u. a. Polyamines in cardiac physiology and disease.
88. Hu J, Mahmoud MI, el-Fakahany EE. Polyamines inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. *Neurosci Lett*. 4. Juli 1994;175(1-2):41–5.
89. Moore PK, Handy RL. Selective inhibitors of neuronal nitric oxide synthase--is no NOS really good NOS for the nervous system? *Trends Pharmacol Sci*. Juni 1997;18(6):204–11.
90. Guerra GP, Mello CF, Sauzem PD, Berlese DB, Furian AF, Tabarelli Z, u. a. Nitric oxide is involved in the memory facilitation induced by spermidine in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 7. April 2006;186(2):150–8.
91. Dobutovic B. Nitric Oxide and its Role in Cardiovascular Diseases. *Open Nitric Oxide J*. 15. Dezember 2011;3(1):65–71.
92. Cotton JM, Kearney MT, Shah AM. Nitric oxide and myocardial function in heart failure: friend or foe? *Heart Br Card Soc*. Dezember 2002;88(6):564–6.
93. Rockman HA, Ross RS, Harris AN, Knowlton KU, Steinhilper ME, Field LJ, u. a. Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15. September 1991;88(18):8277–81.
94. deAlmeida AC, van Oort RJ, Wehrens XHT. Transverse aortic constriction in mice. *J Vis Exp JoVE*. 2010;(38).
95. Sedej S, Schmidt A, Denegri M, Walther S, Matovina M, Arnstein G, u. a. Subclinical abnormalities in sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release promote eccentric myocardial remodeling and pump failure death in response to pressure overload. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. Dezember 2013 [zitiert 2. März 2014]; Verfügbar unter: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0735109713061949>
96. Jalil JE, Doering CW, Janicki JS, Pick R, Shroff SG, Weber KT. Fibrillar collagen and myocardial stiffness in the intact hypertrophied rat left ventricle. *Circ Res*. 1. Juni 1989;64(6):1041–50.
97. Drexler H. Nitric Oxide Synthases in the Failing Human Heart : A Doubled-Edged Sword? *Circulation*. 15. Juni 1999;99(23):2972–5.
98. Zhang P, Xu X, Hu X, van Deel ED, Zhu G, Chen Y. Inducible Nitric Oxide Synthase Deficiency Protects the Heart From Systolic Overload-Induced Ventricular Hypertrophy and Congestive Heart Failure. *Circ Res*. 8. März 2007;100(7):1089–98.
99. Loyer X, Gomez AM, Milliez P, Fernandez-Velasco M, Vangheluwe P, Vinet L, u. a. Cardiomyocyte Overexpression of Neuronal Nitric Oxide Synthase Delays Transition Toward Heart Failure in Response to Pressure Overload by Preserving Calcium Cycling. *Circulation*. 24. Juni 2008;117(25):3187–98.
100. LaRocca TJ, Gioscia-Ryan RA, Hearon CM Jr, Seals DR. The autophagy enhancer spermidine reverses arterial aging. *Mech Ageing Dev*. August 2013;134(7-8):314–20.

101. Madeo F, Eisenberg T, Büttner S, Ruckenstuhl C, Kroemer G. Spermidine: A novel autophagy inducer and longevity elixir. *Autophagy*. 1. Januar 2010;6(1):160–2.
102. Morselli E, Mariño G, Bennetzen MV, Eisenberg T, Megalou E, Schroeder S, u. a. Spermidine and resveratrol induce autophagy by distinct pathways converging on the acetylproteome. *J Cell Biol*. 21. Februar 2011;192(4):615–29.
103. Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*. 2004;6(4):463–77.
104. Maruyama R, Goto K, Takemura G, Ono K, Nagao K, Horie T, u. a. Morphological and biochemical characterization of basal and starvation-induced autophagy in isolated adult rat cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Oktober 2008;295(4):H1599–1607.
105. Pattison JS, Osinska H, Robbins J. Atg7 Induces Basal Autophagy and Rescues Autophagic Deficiency in CryABR120G Cardiomyocytes. *Circ Res*. 8. Juli 2011;109(2):151–60.
106. Tannous P, Zhu H, Nemchenko A, Berry JM, Johnstone JL, Shelton JM, u. a. Intracellular Protein Aggregation Is a Proximal Trigger of Cardiomyocyte Autophagy. *Circulation*. 17. Juni 2008;117(24):3070–8.
107. Rothermel BA, Hill JA. Autophagy in load-induced heart disease. *Circ Res*. 5. Dezember 2008;103(12):1363–9.
108. Nakai A, Yamaguchi O, Takeda T, Higuchi Y, Hikoso S, Taniike M, u. a. The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat Med*. Mai 2007;13(5):619–24.
109. Kubli DA, Gustafsson ÅB. Mitochondria and mitophagy: the yin and yang of cell death control. *Circ Res*. 12. Oktober 2012;111(9):1208–21.
110. Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, Nelson JF, Astle CM, Flurkey K, u. a. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* [Internet]. 8. Juli 2009 [zitiert 12. Februar 2014]; Verfügbar unter: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature08221>
111. Noda T. Tor, a Phosphatidylinositol Kinase Homologue, Controls Autophagy in Yeast. *J Biol Chem*. 13. Februar 1998;273(7):3963–6.
112. Jung CH, Ro S-H, Cao J, Otto NM, Kim D-H. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett*. April 2010;584(7):1287–95.
113. Gao X-M, Wong G, Wang B, Kiriazis H, Moore X-L, Su Y-D, u. a. Inhibition of mTOR reduces chronic pressure-overload cardiac hypertrophy and fibrosis: *J Hypertens*. August 2006;24(8):1663–70.
114. Shioi T. Rapamycin Attenuates Load-Induced Cardiac Hypertrophy in Mice. *Circulation*. 1. April 2003;107(12):1664–70.

115. McMullen JR. Inhibition of mTOR Signaling With Rapamycin Regresses Established Cardiac Hypertrophy Induced by Pressure Overload. *Circulation*. 22. Juni 2004;109(24):3050–5.
116. Zhang D, Contu R, Latronico MVG, Zhang JL, Rizzi R, Catalucci D, u. a. MTORC1 regulates cardiac function and myocyte survival through 4E-BP1 inhibition in mice. *J Clin Invest*. 2. August 2010;120(8):2805–16.
117. Smoliga JM, Baur JA, Hausenblas HA. Resveratrol and health - A comprehensive review of human clinical trials. *Mol Nutr Food Res*. August 2011;55(8):1129–41.
118. Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov*. Juni 2006;5(6):493–506.
119. Ghanim H, Sia CL, Abuaysheh S, Korzeniewski K, Patnaik P, Marumganti A, u. a. An antiinflammatory and reactive oxygen species suppressive effects of an extract of *Polygonum cuspidatum* containing resveratrol. *J Clin Endocrinol Metab*. September 2010;95(9):E1–8.
120. Holthoff JH, Woodling KA, Doerge DR, Burns ST, Hinson JA, Mayeux PR. Resveratrol, a dietary polyphenolic phytoalexin, is a functional scavenger of peroxynitrite. *Biochem Pharmacol*. Oktober 2010;80(8):1260–5.
121. Krams R, Kofflard MJM, Duncker DJ, Von Birgelen C, Carlier S, Kliffen M, u. a. Decreased Coronary Flow Reserve in Hypertrophic Cardiomyopathy Is Related to Remodeling of the Coronary Microcirculation. *Circulation*. 27. Januar 1998;97(3):230–3.
122. Rakusan K, Flanagan MF, Geva T, Southern J, Van Praagh R. Morphometry of human coronary capillaries during normal growth and the effect of age in left ventricular pressure-overload hypertrophy. *Circulation*. 1. Juli 1992;86(1):38–46.

7. Lebenslauf

Corinna Simonini

Adresse:

Teichweg 17
9581 Ledenitzen
Österreich

E-Mail: corinna.simonini22@gmail.com

Tel.: 0043 699 11701986



Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 22. Juni 1990
Geburtsort: Villach (Österreich)
Staatsbürgerschaft: österreichische
Familienstand: ledig

Schulische Ausbildung

Seit 10/2009	Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Universität Graz
2000 - 2008	Bundesgymnasium St. Martin (Villach) Abschluss: Matura
1996 - 2000	Volkschule Ledenitzen

Auslandsaufenthalte/Auslandsfamulaturen

07/2012 – 08/2012 Berlin	4-wöchige Famulatur Abteilung für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie	Charité Universitätsklinikum Campus Benjamin Franklin Berlin, Deutschland
-----------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------

Pflichtfamulaturen:

02/2011	2-wöchige Pflichtfamulatur Abteilung für Unfallchirurgie	Landeskrankenhaus Villach Villach, Österreich
04/2011	2-wöchige Pflichtfamulatur Abteilung für Pathologie	Landeskrankenhaus Villach Villach, Österreich
09/2011	2-wöchige Pflichtfamulatur Abteilung für Gynäkologie	Landeskrankenhaus Villach Villach, Österreich
01/2012 – 02/2012	2-wöchige Pflichtfamulatur Abteilung für Pathologie	Universitätsklinikum Graz Graz, Österreich
03/2012 – 04/2012	2-wöchige Pflichtfamulatur Abteilung für Gynäkologie	Landeskrankenhaus Villach Villach, Österreich
03/2013 – 04/2013	2-wöchige Pflichtfamulatur Abteilung für Gynäkologie	Landeskrankenhaus Villach Villach, Österreich
09/2013	4-wöchige Pflichtfamulatur Abteilung für Innere Medizin	Landeskrankenhaus Villach Villach, Österreich
05/2014	2-wöchige Famulatur Abteilung für Innere Medizin	Landeskrankenhaus Villach Villach, Österreich

Spezialstudienmodule:

- 1) Von der Theorie zur Praxis: Chirurgische Operationslehre
- 2) Case-based Learning in Klinik und Praxis
- 3) Chirurgische PatientInnenbetreuung
- 4) Erkrankungen des Knochens und der Gelenke
- 5) Phlebologie und Wundheilung

Sonstige Berufserfahrung:

07/2006 – 09/2012	Assistenz der Geschäftsfeldleitung	Berufsförderungsinstitut
	für öffentliche Kunden und	Kärnten
	Arbeitsmarktpolitik	Klagenfurt, Österreich

Sprachkenntnisse:

Deutsch

Englisch

Italienisch

Portugiesisch