

Aus der Klinik für Herzchirurgie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. H.H. Sievers

Blutfluss, Sauerstoffpartialdruck und Kapillardichte im elektrisch stimulierten Musculus latissimus dorsi

**Ein Beitrag zur indirekten muskulären Myokardrevaskularisation mit
dynamischem Girdling und zur Optimierung muskulärer Blutpumpen**

Inauguraldissertation

zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Philipp Otto Schwarz
aus Bad Segeberg
-Lübeck 2006-

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. N.W. Guldner

2. Berichterstatter/in: Priv.-Doz. Dr. med. E.-M. Ehlers

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2007

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 14.12.2007

gez. Prof. Dr. med. W. Solbach
-Dekan der Medizinischen Fakultät-

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Problemstellungen	1
1.1	Einleitung	1
1.1.1	Myokardrevaskularisation	3
1.1.2	Muskuläre Therapie der terminalen Herzinsuffizienz	6
1.1.3	Grundlagen der Neovaskularisation	11
1.1.4	Angiogenese durch Elektrostimulation von Skelettmuskeln	13
1.2	Problemstellungen	17
2	Material und Methoden	18
2.1	Versuchstiere	18
2.1.1	Auswahl	18
2.1.2	Der Musculus latissimus dorsi beim Menschen und bei der Ziege	19
2.2	Myostimulator, Stimulationsmuster und Elektroden	20
2.3	Operationsverfahren	21
2.4	Intraoperative Messungen	23
2.4.1	Messung des Blutflusses	23
2.4.2	Messung des Sauerstoffpartialdrucks	23
2.5	Bestimmung der Kapillaranzahl pro Muskelfaser	24
2.5.1	Materialgewinnung	24
2.5.2	Histologische Anfärbung	24
2.5.3	Mikroskopische Auswertung	28
2.6	Statistische Verfahren	30
3	Ergebnisse	31
3.1	Tiere	31
3.2	Blutfluss	31
3.3	Sauerstoffpartialdruck	34
3.4	Kapillaranzahl pro Muskelfaser	36
4	Diskussion	38

4.1 Tiere	38
4.2 Blutfluss	38
4.3 Sauerstoffpartialdruck	41
4.4 Kapillaranzahl pro Muskelfaser	42
4.4.1 Wahl des Stimulationsmusters für die zweiwöchige Prästimulation	42
4.4.2 Kapillarvermehrung	45
4.5 Ausblick	48
5 Zusammenfassung	52
6 Anhang	54
6.1 Tabellen	54
6.1.1 Blutfluss	54
6.1.2 Sauerstoffpartialdruck	61
6.1.3 Kapillaranzahl pro Muskelfaser	68
6.2 Veröffentlichungen	71
6.3 Genehmigung Tierexperimente	71
6.4 Danksagungen	72
6.5 Literaturverzeichnis	73
6.6 Curriculum Vitae von Philipp Otto Schwarz	86

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
bpm	beats per minute
CD	Kapillardichte (mm ²)
C/F	Kapillarenanzahl pro Muskelfaser
EKG	Elektrokardiogramm
FGF	fibroblast growth factor
Hz	Hertz
IMA	A. mammaria interna
IMR	indirekte Myokard- revaskularisation
KHK	koronare Herzerkrankung
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MLD	M. latissimus dorsi
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NO	Stickstoffmonoxid
RIVA	Ramus interventrikularis anterior
TA	M. tibialis anterior
Tab.	Tabelle
VEGF	vascular endothelial growth factor
FDA	U.S. Food and Drug Administration

1 Einleitung und Problemstellungen

1.1 Einleitung

In den westlichen Industrieländern sind Herz-Kreislauf-Erkrankungen die Todesursache Nummer Eins (1). Hierzu zählt die koronare Herzerkrankung (KHK) mit einer Mortalität von 3-13% (70), sowie die terminale Herzinsuffizienz im Stadium IV, die eine Mortalität von 50% aufweist (109). Beide Erkrankungen machen ergänzende Therapieverfahren erforderlich, weil:

1. Patienten mit einer Mikroangiopathie („small vessel disease“) in der Regel nicht bypassfähig sind.
2. mechanische Pumpsysteme eine hohe Thrombembolierate aufweisen und wegen der hohen Kosten nur begrenzt zur Verfügung stehen.
3. Spenderherzen nur in geringem Maße zur Verfügung stehen.

Muskuläre Herzunterstützungssysteme, für die in der vorliegenden Arbeit Grundlagen geschaffen werden sollen, könnten vermutlich wirkungsvolle, ergänzende Therapiemaßnahmen darstellen.

Bei der koronaren Herzerkrankung (KHK) kommt es zu einer Minderperfusion des Myokards, die sich in der Regel auf koronare Stenosen zurückführen lässt. Häufige Ursachen sind arteriosklerotische Plaques, die das Gefäßlumen einengen (141). In Abhängigkeit der Klinik und der Koronarmorphologie kann die Behandlung internistisch oder chirurgisch erfolgen. Gibt es keine Möglichkeit mehr die KHK konservativ zu behandeln, wird je nach Beschaffenheit der Stenose eine Ballonkatheterdilatation mit Stenteinlage vorgenommen oder es erfolgt die direkte Koronarrevaskularisation.

Seit Ende der 60er Jahre wird die von Favaloro (46) entwickelte direkte Bypasschirurgie durchgeführt, bei der mittels eines Vena-saphena-Grafts oder eines arteriellen Grafts das stenotische Segment einer Koronararterie überbrückt wird. Allerdings muss bei dieser Mikroanastomosierung das Mindestkaliber des verschlossenen Herzkranzgefäßes 1 mm betragen. Gleichzeitig sollte auch noch der distal der Stenose gelegene Teil des Gefäßes frei von arteriosklerotischen Veränderungen sein, um ein freies Abstromgebiet des Bypasses zu gewährleisten. Sobald eine pathologische Gefäßmorphologie dünnerer nicht mehr anastomosierbarer Koronargefäße vorliegt, können eine ganze Reihe von KHK-Patienten

nicht durch eine direkte Koronarrevaskularisation behandelt werden. Zu dieser Patientengruppe gehören auch Menschen mit der Mikroangiopathia diabetica oder mit einer „small vessel disease“ (108). Versorgt man nämlich ein derart verändertes Gefäßsystem mit einem geringen Koronarblutfluss über eine koronare Venenbrücke oder über einen arteriellen Bypass, droht durch eine Flussverlangsamung eine frühe Thrombosierung des Bypasses. So kann dieser Patientengruppe im fortgeschrittenen Stadium nur noch eine Herztransplantation helfen, deren Anzahl wegen des Spendermangel sehr eingeschränkt ist. Nach frühen Versuchen der indirekten Myokardrevaskularisation (siehe 1.1.1) wurde Anfang und Mitte der 90er Jahre eine neue chirurgische Methode als Alternativbehandlung für diese Patientengruppe erprobt. Beyer et al. entwickelten ein Verfahren zur muskulären, myokardialen Revaskularisation, bei dem ein freies Skelettmuskeltransplantat auf den Herzmuskel gesetzt wird. Diese Technik der indirekten Myokardrevaskularisation (IMR) wurde zunächst im Tierversuch erprobt (Hund 1992-1993), später auch an mehr als 30 Patienten durchgeführt (1993-2006).

Bei der terminalen Herzinsuffizienz ist das Herzminutenvolumen schon unter Ruhebedingungen reduziert. Ursachen sind z.B. eine chronische KHK, chronische Klappenvitien oder Kardiomyopathien. Es kommt zu einer nachlassenden Förderleistung des Herzens mit einem pulmonalem Rückstau mit Dyspnoe und einer verminderten Perfusion der Peripherie. Hieraus resultiert eine Leistungsminderung und allgemeines Krankheitsgefühl. Man kann den Krankheitsverlauf zunächst medikamentös behandeln, aber nicht aufhalten. Die Herztransplantation ist heute bei der terminalen Herzinsuffizienz die einzige definitive Therapie. Es werden allerdings jährlich deutlich weniger Transplantationen vorgenommen als benötigt. Im Jahre 2004 wurden in Deutschland nur 372 Herzverpflanzungen vorgenommen (45), zusätzlich scheint es zu einem Rückgang der Verfügbarkeit von Spenderorganen zu kommen (39,45,85,90). So werden auch hier dringend Alternativen besonders auch im Vorfeld zur Herztransplantation gesucht. Prinzipiell stehen mechanische und biologische (muskuläre) Herzunterstützungssysteme zur Verfügung, wobei die mechanischen im Allgemeinen zur Überbrückung bis zu einer folgenden Herztransplantation dienen. Doch selbst nach langer Wartezeit steht häufig kein Organ zur Verfügung. Muskuläre Herzmuskelunterstützungssysteme sollen hier den Bedarf zum Teil

decken. Bei ihnen wird ein körpereigener Muskel verwendet, meist der Musculus latissimus dorsi, der bisher klinisch als Kardiomyoplastik und experimentell als muskuläre Blutpumpe eingesetzt wird.

1.1.1 Myokardrevaskularisation

1.1.1.1 Historischer Überblick

Bei Patienten, die an einer Perikarditis verstorben waren, stellten bereits 1932 Moritz et al. (15) fest, dass die ausgeprägten epi-perikardialen Verwachsungen reich vaskularisiert waren und erweiterte arterielle Gefäße enthielten. Durch künstliche Induktion chronischer Entzündungen wurde versucht, die Ausbildung solcher Kollateralkreisläufe zu bewirken. Hierfür verwendete man Talcum, Sand oder Asbest (15), womit eine aseptische Perikarditis hervorgerufen wurde. Auch die Transplantation gut vaskularisierter Gewebe auf das Herz sollte die Myokardperfusion verbessern, es wurden hierfür Omentum aus dem Abdomen, Lungengewebe, Dünndarm und Hautlappen mit anhaftendem subkutanem Gewebe eingesetzt (15). Beck et al. (15) transplantierten bereits 1937 einen gestielten Skelettmuskellappen auf die Vorderwand des Herzens; Wochen nach der Operation berichteten sie über eine deutliche Besserung der Beschwerden. 1957 führten Bakst et al. (9) die gleiche Operation durch, allerdings in Kombination mit einer Kardioperikardiopexie, die sie mit Magnesiumsilicat auslösten. Sie wiesen post mortem durch Injektion von Neopren-Latex die Füllung des Koronarkreislaufes über die neuen Kollateralen nach.

Der Chirurg Arthur Vineberg (138) implantierte die Arteria mammaria interna direkt ohne koronare Anastomose in einen myokardialen Tunnel. Sewell (121,122) und Favaloro et al. (47) verbesserten diese Technik, so dass sie die erfolgreichste und am häufigsten verwendete Methode zur Myokardrevaskularisation wurde. Aufgrund des hohen Operationsrisikos - hauptsächlich durch Blutungen (21) – sowie auch wegen der stetigen Optimierung der Bypasschirurgie mit direkten Anastomosen, verließ man die Vineberg'sche Operation zu Beginn der 70er Jahre. Trotz der Erfolge der aortokoronaren Bypasschirurgie wurde die indirekte Myokardrevaskularisation weiter erforscht. Schließlich gelang es seit den sechziger Jahren durch Einführung spezieller mikrochirurgischer Instrumente und Nahtmaterialien, erfolgreich Gewebe zu transplantieren. So benutzte man freie Muskellappen mit und ohne anhaftender Haut und Unterhautfettgewebe zur Deckung größerer Gewebsdefekte. Jacobson und Suarez (80) stellten 1960 unter

Zuhilfenahme eines Operationsmikroskops und anderer neuer Geräte erfolgreich Anastomosen von Gefäßen mit externem Durchmesser von 1mm her. Tamai et al. (131) gelang 1970 erstmals ein freies Muskeltransplantat mit neurovaskulären Mikroanastomosen. 1982 benutzten Christ und Spira (34) einen gestielten M. latissimus dorsi-Lappen um linksventrikuläre Wandschwächen nach Infarkten zu decken. Im Zuge dessen beschrieben auch sie eine myokardiale Neovaskularisation über das Transplantat. Doch dies wurde im Einzelnen nicht untersucht. Im Jahre 1992 revaskularisierten Beyer et al. ischämisches Herzmuskelgewebe zunächst bei Hunden (18,19) und dann auch beim Menschen (16) mit einem frei transplantierten Skelettmuskellappen.

1.1.1.2 Aktueller Stand der indirekten Myokardrevaskularisation (IMR)

1992 transplantierten Beyer et al. (20) im Tierversuch den M. pectoralis auf die vorher experimentell infarzierte Herzvorderwand beim Hund. Der Muskellappen erhielt eine End-zu-End-Anastomose mit der A. mammaria interna (A. thoracica interna), um die arterielle Perfusion zu gewährleisten. Der venöse Abfluss erfolgte über einen Venenbypass in das rechte Herzohr. Man erstellte post mortem Gefäßausgusspräparate des Herzens mit dem darauf transplantierten Skelettmuskel. Über die beiden Koronarostien wurde ein rotes Kunstharz injiziert und über die mit dem Skelettmuskel anastomosierte A. mammaria interna ein blaues Kunstharz. So konnte man zeigen, dass es zu einer deutlichen Gefäßeinsprossung vom Transplantat aus in das Myokard kam und sich sogar Anastomosen zwischen Transplantat und Koronargefäßen bildeten.

In einer zweiten Versuchreihe sollte diese Neovaskularisation auf ihre funktionellen Aspekte hin untersucht werden (17). Man setzte gleichzeitig mit der Transplantation einen Amyloidkonstriktor im oberen Drittel des RIVA (Ramus interventrikularis anterior) ein. So konnte ein gradueller Verschluss des Koronargefäßes durch das langsam anschwellende Amyloid erzeugt werden. Nach komplettem Verschluss wurde mit Hilfe radiologischer Mikrosphärentechnik der regionale Blutfluss untersucht. Dies erbrachte den Nachweis, dass trotz des mangelnden Blutflusses über den RIVA und trotz fehlender myokardialer Kollateralen im Versorgungsgebiet ein nahezu unveränderter regionaler myokardialer Blutstrom zu messen war. Damit wurde bewiesen, dass man durch ein Skelettmuskeltransplantat eine funktionelle Myokardrevaskularisation

erreichen kann, die imstande ist, einen kompletten Koronarverschluss zu kompensieren.

Aufgrund dieser Ergebnisse wandte man die Methode der indirekten Myokardrevaskularisation im Mai 1993 erstmals klinisch an (16). Die Patienten litten an einer therapierefraktären 2- bis 3-Gefäß-KHK mit einer ausgeprägten Angina pectoris-Symptomatik bei einem Alter > 65 Jahren. Im Belastungs-EKG konnte man auf niedriger Belastungsstufe ischämische ST-Streckenveränderungen feststellen. Im Gegensatz zur tierexperimentellen Operation wurde statt des M. pectoralis der M. latissimus dorsi als Graft eingesetzt. Der M. latissimus dorsi schien besser als Transplantat geeignet, denn er besitzt einen dominanten Gefäßstiel. Dies erlaubte eine direkte aortale End-zu-Seit-Implantation. Der venöse Fluss wurde in das rechte Herzohr geleitet. Das Transplantat war mit wenigen epi-perikardialen Nähten fixiert worden. Vorher raute man die Herzwand mit einem Abrazzo-Schwämmchen auf, bis punktförmige Blutungen entstanden. Die blutige subkutane Seite des Skelettmuskels wurde mit ihnen in Kontakt gebracht. Dieses Vorgehen war in vorherigen Tierversuchen erarbeitet worden. Es zeigte sich nämlich, dass das Epikard und die Muskelfaszie eine natürliche Barriere darstellen, wodurch der Austausch angiogenetischer Faktoren verhindert und die Aussprossung von Kollateralen behindert wird. 3-4 Wochen postoperativ waren alle Patienten beschwerdefrei und konnten auf Nitropräparate verzichten. Nach diesem Zeitraum erhobene Belastungs-EKGs zeigten eine im Durchschnitt um 50 Watt höhere Belastbarkeit der Patienten, ohne die präoperativ bestehenden ischämischen ST-Veränderungen weiterhin nachweisen zu können. Bei Belastungsspitzen jedoch kam es bei allen Patienten zu Dyspnoe und Unwohlsein (16). Diese Symptome bildeten sich in Ruhe schnell wieder zurück, ohne dass die Patienten Nitropräparate verwenden mussten. Alle Behandelten gaben eine deutliche Besserung der Lebensqualität an. In einem Fall wurde durch ein EKG-getriggertes Kontrast-CT die tatsächliche indirekte Revaskularisation des Myokards über den Skelettmuskelgraft nachgewiesen.

1.1.2 Muskuläre Therapie der terminalen Herzinsuffizienz

Bei der terminalen Herzinsuffizienz stehen derzeit nur wenige Therapieoptionen zur Verfügung. Die einzige definitive Überlebenschance bietet die Transplantation eines Spenderherzens. Diese Methode ist wegen des Spendermangels in der Regel nur bei ausgewählten Patienten möglich. Mechanische, d.h. künstliche linksventrikuläre Herzunterstützungssysteme weisen wiederum ein hohes Thrombembolierisiko auf. So liegt es nahe, bei einem zugrunde gegangenen Herzmuskel, einen körpereigenen Skelettmuskel als kontraktile Ersatz zu erproben. Dieser sollte dann im Stande sein, das Herz zu unterstützen und für nichttransplantierbare Patienten eine alternative Behandlung zu ermöglichen. Die Geburtsstunde der muskulären Herzunterstützung beginnt mit Studien zur Aortomyoplastik an Hunden durch Kantrowitz 1958 (82). In diesen Versuchen wurde ein Teil des Zwerchfells um die Aorta geschlungen und während der Diastole elektrisch zur Kontraktion gebracht. Der Muskel ermüdete bereits nach wenigen Minuten und terminierte somit die Kreislaufunterstützung stark. Die Skelettmuskulatur schien nicht ausdauernd genug zu sein. So vertauschte der Physiologe Buller 1960 den Nerven eines schnellen und ermüdbaren Muskels (Typ-II-Muskelfasern) mit dem eines langsamen, ausdauernden Muskels (Typ-I-Muskelfasern). Es fand eine Umwandlung von einem langsamen, ausdauernden Muskel in einen schnellen, ermüdbaren und umgekehrt statt. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass die Faserzusammensetzung eines Muskels von seiner Innervation, bzw. seiner Stimulationsfrequenz abhängt (24,25). Ein Skelettmuskel mit Typ-I-Fasern erhält nervale Impulse mit einer Frequenz von 10 Hz und ein Skelettmuskel mit Typ-II-Fasern mit einer Frequenz von 50-100 Hz (6). Salmons und Sreter versuchten in den 60iger Jahren eine muskuläre Umwandlung mit Hilfe elektrischer Stimulation nachzuahmen. Sie erreichten mit einer Dauerstimulation von 10 Hz nach 6-8 Wochen, dass ein Skelettmuskel mit Typ-I-Fasern entstand (113,117,129). Das Problem der Ermüdung schien gelöst zu sein.

Im Jahr 1966 nutzte Termet den M. latissimus dorsi als ein das Herz umschließendes Muskelkorsett. Diese sogenannte Kardiomyoplastik erzeugte durch elektrische Stimulation des Muskels im akuten Hunderversuch nach der Induktion eines Herzstillstandes arterielle Drücke von 60-80 mmHg (135). Durch Weiterentwicklung der Kardiomyoplastik konnte mittels eines Kardiomyostimulators der um das insuffiziente Herz geschlungene, gestielte Musculus latissimus dorsi eine mit der Herzaktion gekoppelte „interne Herzmassage“

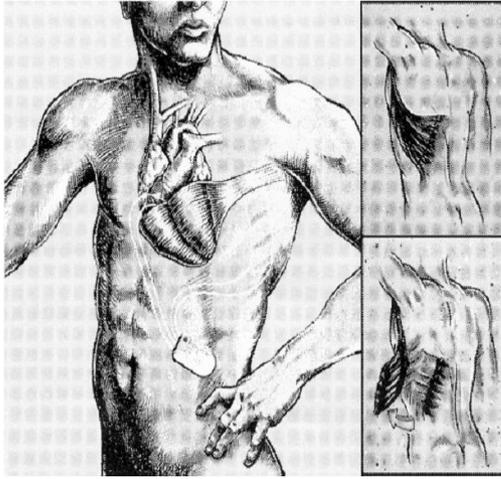


Abbildung 1: Kardiomyoplastik beim Menschen aus: A. Carpentier et al. *Cardiac Assist.* S. 196, 1997

erzeugen und die Pumpleistung verbessern (40,97). 1985 kam sie erstmals durch Carpentier zur klinischen Anwendung (26). Über 1000 Patienten erhielten bis heute eine Therapie im Sinne eines Wickelherzens. Der hämodynamische Effekt war jedoch klinisch unbedeutend, da der in Typ-I-Muskelfasern transformierte Muskel erheblich an Kraft und Leistung verlor (33,100,114,115). Trotz fehlender Erhöhung der kardialen Auswurfleistung kam es bei einzelnen Patienten zur Abnahme der klinischen Beschwerdesymptomatik (28). Dies führte man auf einen Korsetteffekt zurück. Dieser Effekt wirkt sowohl einer zunehmenden Wandspannung wie auch einer Myokarddilatation entgegen und führt somit zu einer myokardialen Sauerstoffeinsparung. Nebenbefundlich wurden nach kardiomyoplastischen Eingriffen außerdem vaskuläre Einsprossungen aus dem Skelettmuskellappen in das Myokard beschrieben (93).

Mit einem 1980 von Chiu, Drinkwater und Dewar entwickelten implantierbarem Muskelschrittmacher konnte man tetanische Einzelkontraktionen eines Muskels erzeugen und ihn herzsynchron als Pumpe einsetzen (40). Seitdem arbeiten verschiedene Arbeitsgruppen weltweit an der Verwirklichung einer autologen muskulären Blutpumpe, den sogenannten Skelettmuskelventrikeln. Der Skelettmuskel wurde zunächst extrathorakal geformt und einer zweiten Operation als Pumpventrikel in den Kreislauf eingebracht (4,5,32,58,71,92). Die Pumpleistung war allerdings auch hier minimal. Abbildung 2 und 3 zeigen den Kraft- und Leistungsverlust des in Typ-I-Muskelfasern umgewandelten Skelettmuskels. Außerdem geht der aktive Typ-I-Muskel bei Belastung eine Sauerstoffschuld ein und wird dabei zerstört, wie später noch zu berichten sein wird. Diese Problematik gilt es zu überwinden, damit die muskuläre Herzunterstützung endlich zum dringend benötigten klinischen Einsatz kommen kann.

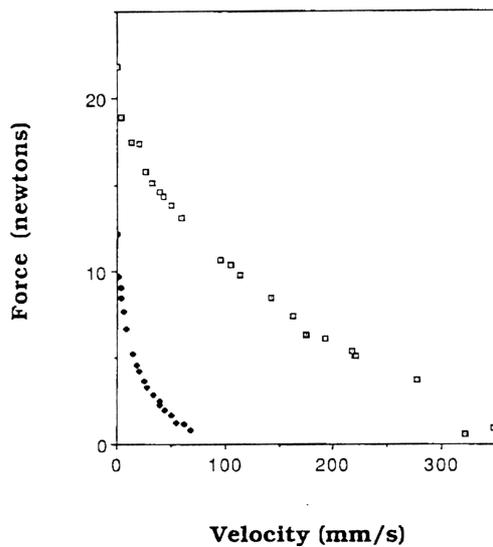


Abbildung 2: Kraft-Geschwindigkeits-Verhalten eines unstimulierten *Musculus tibialis anterior* (helle Symbole) und eines 11-wöchig elektrisch stimulierten Muskels (dunkle Symbole) beim Kaninchen, übernommen aus: Salmons S, Jarvis JC: *The working capacity of skeletal muscle transformed for use in a cardiac assist role. Transformed muscle for cardiac assist.* Eds: Chiu RCJ, Bourgeois IM. Future Publishing NY (1990), S. 96

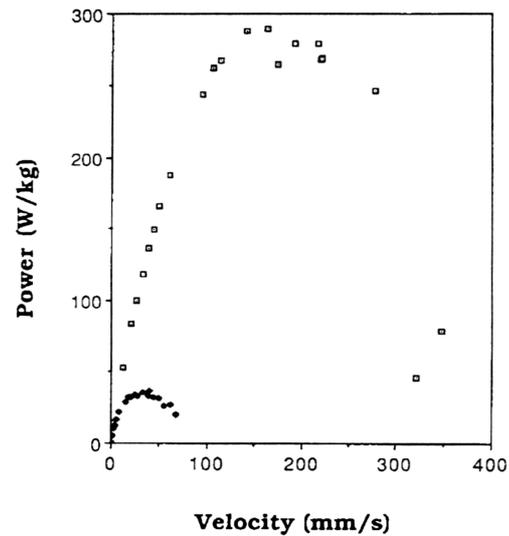


Abbildung 3: Leistungs-Geschwindigkeits-Verhalten eines unstimulierten *Musculus tibialis anterior* (helle Symbole) und eines 11-wöchig elektrisch stimulierten Muskels (dunkle Symbole) beim Kaninchen, übernommen aus: Salmons S, Jarvis JC: *The working capacity of skeletal muscle transformed for use in a cardiac assist role. Transformed muscle for cardiac assist.* Eds: Chiu RCJ, Bourgeois IM. Future Publishing NY (1990), S. 98

Bei der Aortomyoplastik wird eine Muskelschlinge aus dem *Musculus latissimus dorsi* direkt um die Aorta ascendens (136) oder die Aorta descendens (35) gelegt. EKG-getriggert wird durch einen Myostimulator während der Diastole eine Kontraktion ausgelöst. So wird ein Rückfluss in Richtung Aortenwurzel bewirkt und dadurch werden die Koronargefäße über eine Aortenmitteldruckserhöhung zusätzlich perfundiert. Außerdem kommt es präsystemisch durch die Relaxation des Muskels zu einer Nachlastsenkung für die linke Herzkammer, wodurch wiederum der Sauerstoffverbrauch des Myokards verringert wird.

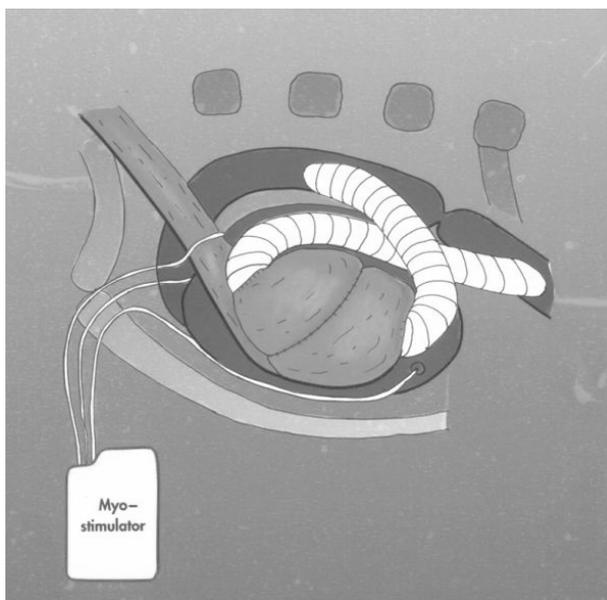


Abbildung 4: Biomechanisches Herz im Thorax einer Ziege aus: N.W. Guldner. Entwicklung eines im Kreislauf trainierten Biomechanischen Herzen. Habilitationsschrift, Universität zu Lübeck. Abb. 10, 1997

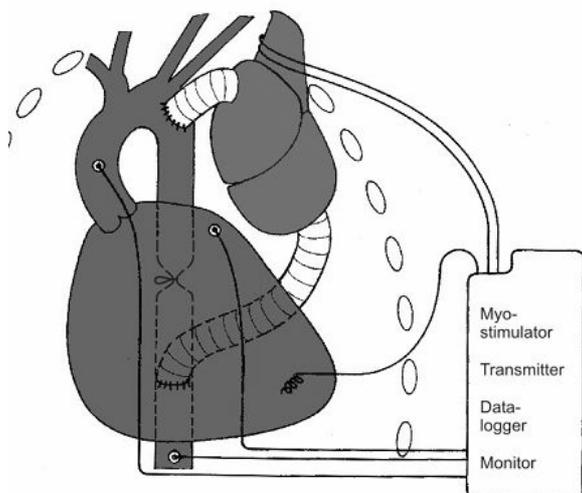


Abbildung 5: Biomechanisches Herz im Thorax des Menschen (N.W. Guldner) aus: P. Feindt et al.. Synopsis der biologischen und mechanischen Kreislaufunterstützung. S.221, 2003

In den letzten Jahren sind experimentelle Blutpumpen entwickelt worden, die mit Hilfe des Musculus latissimus dorsi als Skelettmuskelventrikel ihre Pumpleistung erbringen. Dazu wird ein konstruierter Skelettmuskelventrikel oder eine mit dem M. latissimus dorsi umschlungene Pumpkammer in den Blutkreislauf eingebracht. In Lübeck (Guldner et al.) wurden in den letzten Jahren neue Stimulations- und Trainingsverfahren und der Durchgangs- oder „Tube“-Ventrikel im Gegensatz zum Sackventrikel erprobt (62,63,66). Guldner et al. oder Stephenson et al. setzen diese Durchflussventrikel parallel zur thorakalen Aorta descendens ein. Beim Biomechanischen Herz von Guldner et al. (65) wird der gestielte M. latissimus dorsi um eine Polyurethanpumpkammer gewickelt und über einen Muskelschrittmacher diastolisch zur Kontraktion gebracht (Abb. 4-6). Die verwendeten Skelettmuskeln wurden vor ihrem Einsatz elektrisch trainiert und hierbei medikamentös durch den Einsatz

des β -2-Stimulators Clenbuterol unterstützt. Erst dies ermöglichte eine Pumpleistung von 1,4 Litern pro Minute (64).

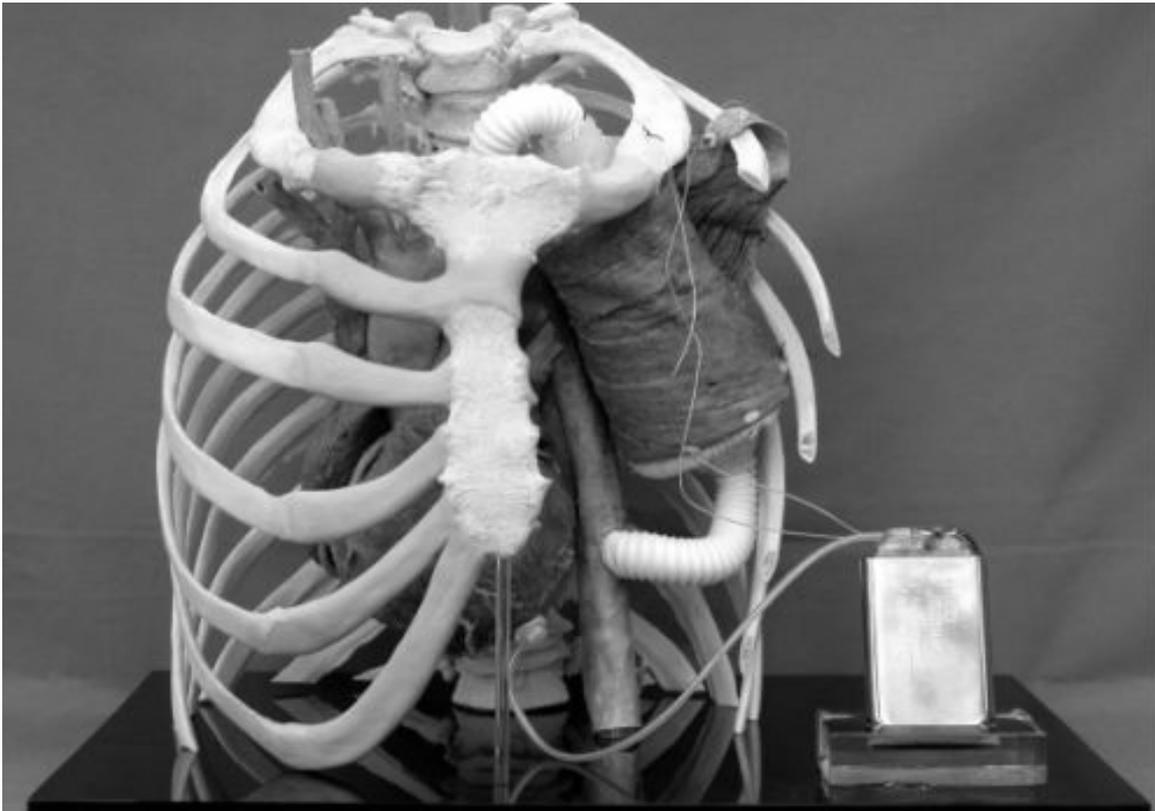


Abbildung 6: Biomechanisches Herz im Thorax des Menschen aus: J. Maynicke et al.. Das Biomechanische Herz: Die Herstellung eines humananatomischen Anschauungsmodells vor einer klinischen Erstanwendung in Ergänzung bisheriger tierexperimenteller Studien. Der Präparator 51.1: 86-90, 2005

1.1.3 Grundlagen der Neovaskularisation

1.1.3.1 Die Angiogenese

Definitionsgemäß umfasst der Begriff Angiogenese zum einen die Kapillarogenese und zum anderen die Arteriogenese. Der Gesamtvorgang der Neovaskularisation lässt sich in drei Abschnitte untergliedern:

1. Die Auflockerung der Basalamembran durch Proteasen, Lokomotion und Migration von Endothelzellen. Diese Vorgänge führen unter anderem durch das Einwirken von VEGF zur Sprossbildung.
2. Die Mitogenese der Endothelzellen bewirkt z.B. unter dem Einfluss von VEGF das Ausbilden der ersten Sinusoide und Kapillaren.
3. Es kommt zur Dilatation der neuen Kapillaren, die Durchblutung setzt in ihnen ein.

Eine differenzierte Betrachtungsweise erfolgt nach Folkmann (48-50): Die mitogene Aktivität der Endothelzelle wird durch spezifische Wachstumsfaktoren induziert, wobei VEGF der wichtigste zu sein scheint, aber auch Prostaglandine, Heparin, Laktat, Histamin, ein erniedrigter pH-Wert und der bFGF (basic fibroblast growth factor) sind von Bedeutung (14,55,56,59,75,84,91,107,118,139). Wenn Endothelzellen proliferieren, werden Proteasen sezerniert, die zur Auflösung der Basalmembran führen. Durch die proteolytisch eröffnete Lamina basalis stülpen die Endothelzellen protoplasmatische Fortsätze aus, die sich untereinander verbinden. Bei weiterem Fortschreiten dieser Mechanismen und der Mitogenese der Endothelzellen entstehen neue gefäßähnliche Strukturen mit Lumina. Es migrieren schließlich Perizyten in die direkte Nachbarschaft der Kapillaren und assoziieren mit den Endothelzellen, wo sie die Bildung der Basalmembran unterstützen (36). So entstehen zunächst Sinusoide und dann Kapillaren, in denen der Blutstrom einsetzt.

Obwohl angiogenetische Faktoren (z.B. VEGF) eine bedeutsame Rolle für die Neovaskularisation spielen, sind sie sicher nicht allein für die Proliferation von Gefäßen verantwortlich. Auch physikalische Einflüsse sind an der Neubildung von Kapillaren beteiligt. Dies lässt sich in neuen Studien bestätigen, wie es in Abschnitt 1.1.4 beschrieben wird.

1.1.3.2 Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF)

Die angiogenetische Aktivität ist beim Erwachsenen üblicherweise eingeschränkt, es werden kaum neue Gefäße gebildet außer bei der zyklischen Regeneration des Endometriums, der Kapillareinsprossung ins Wundbett, bei Fehlbildungen z.B. dem Hämangiom, bei der rheumatoiden Arthritis, der diabetischen Retinopathie und der Psoriasis. Das Größenwachstum von Tumoren wird außerdem durch Gefäßneubildungen unterstützt (51).

Es gibt fünf Isoformen von VEGF (121,145,165,189,206), wobei VEGF₁₆₅ im Serum dominiert. VEGF_{121,145,165} induzieren die Proliferation von Endothelzellen und in vivo die Angiogenese (103,106,140). In Fibroblasten, Monozyten, Makrophagen, Mastzellen, T-Lymphozyten, Leberzellen, Lungengewebe, Neuroektodermalzellen, Myozyten sowie in allen untersuchten Tumorzellen kann mRNA für VEGF nachgewiesen werden.

Bei der Angiogenese induziert VEGF die Expression von Proteasen und des Plasminogenaktivators (PA) und außerdem die Expression des Plasminogenaktivatorinhibitors (PAI) (104). Es werden auch Kollagenasen und der von-Willebrand-Faktor freigesetzt und die Aktivität des Glut-1-Transporters in Endothelzellen erhöht (69,137). Die Proteasen, Kollagenasen und der PA erleichtern das Einwandern und das Aussprossen von Endothelzellen, der PAI gewährleistet möglicherweise die Balance des Prozesses (105). Des Weiteren erhöht VEGF die Gefäßpermeabilität (120). VEGF löst den engen Zell-Zell-Kontakt auf, so können Plasmabestandteile ins Gewebe gelangen und es kann die Migration von Endothelzellen erleichtern (112).

Den stärksten Einfluss auf die VEGF-Synthese haben offensichtlich das lokale Sauerstoff- und Glukoseangebot (125,126). Die Rezeptoren VEGFR-1 (Flt-1) und VEGFR-2 (KDR oder Fkt-1) werden bevorzugt auf Endothelzellen von Blutgefäßen ausgebildet. Lymphgefäße exprimieren hingegen den VEGFR-3 (Flt-4) (81). Ein löslicher Rezeptor (Flt-1) bindet VEGF mit hoher Affinität und inhibiert die VEGF-induzierte Mitogenese (83,84).

Die Aktivierung über den VEGFR-1 führt zu einer Endothelzellmigration (10,119) und VEGFR-2 fördert die Endothelzellproliferation (75,123).

1.1.4 Angiogenese durch Elektrostimulation von Skelettmuskeln

Vorbemerkungen

Aktivität oder elektrische Stimulation von Skelettmuskeln bewirken ein Ungleichgewicht im Gewebe, und zwar zwischen seiner Versorgung mit wichtigen Metaboliten und der dazu erforderlichen Perfusion über Blutgefäße. Als Konsequenz daraus kommt es zum Wachstum von Kapillaren, um das Gewebe mit ausreichend Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen.

Neovaskularisation in stimulierten Skelettmuskeln

Die ersten Untersucher, die über transkutane Elektrostimulation die Kapillardichte in Oberschenkelmuskulatur oder Glutealmuskulatur von Kaninchen zu erhöhen versuchten, waren 1933 Vanotti und Pfister (75) und 1934 Vanotti und Magiday (75). Obwohl sie die Muskeln ihrer Tiere nur 5 Minuten pro Tag über 4-6 Wochen stimulierten, konnte eine Zunahme der Dichte von Venen und Arterien verzeichnet werden. Gleichzeitig erhöhte sich die Zahl der Anastomosen zwischen den Gefäßen.

Wie kommt es aber zum Kapillarwachstum? Welche Faktoren sind ausschlaggebend?

H. Hoppeler (72) stellt 1999 in seiner Arbeit „Vascular growth in hypoxic skeletal muscle“ fest, Hypoxie allein habe ohne andere Stressoren wie Bewegung oder Kälte nur einen geringen Effekt auf die Kapillarisation im Skelettmuskel. Das Kapillarwachstum im Skelettmuskel des Erwachsenen wird unter anderem durch mechanische Faktoren initiiert, die durch Muskelaktivität induziert werden. Diese wirken auf die luminale und abluminale Seite der Gefäße ein.

A. Faktoren und Wirkungen von luminal

Der erhöhte Blutfluss führt zu Schäden an der Glykokalyx von Endothelzellen (22), was das Hineinstülpen von Endothelzellen in das Lumen ermöglicht und damit letztendlich die Teilung des Lumens hervorruft. Außerdem führt er zu:

1. erhöhter Schubspannung, es kommt zur Freisetzung von VEGF, das zu Proliferation und Migration der Endothelzellen führt.

2. erhöhtem Durchmesser, der zu verstärkter Wandspannung in den Gefäßen führt.
3. erhöhter Wandspannung, die eine Abflachung der Endothelzellen bewirkt und somit empfänglicher für Wachstumsfaktoren macht (z.B. VEGF).

B. Faktoren und Wirkungen von abluminal

Auf der abluminalen Seite ist während der elektrischen Stimulation der Skelettmuskulatur die verstärkte Dehnung des Gewebes der entscheidende Faktor. Es werden Matrixmetalloproteinasen freigesetzt, die abluminal die Basalmembran auflösen und so ein Aussprossen der Endothelzellen begünstigen (111). Außerdem wird die Sezernierung von VEGF gefördert (43).

Die Faktoren und Wirkungen von luminal und abluminal sind in Abbildung 7 zusammengefasst.

A. Faktoren und Wirkungen von luminal

Erhöhter Blutfluss führt zu:

- erhöhter Schubspannung
- erhöhtem Durchmesser
- erhöhter Wandspannung

B. Faktoren und Wirkungen von abluminal

Dehnung der Muskelfasern führt zu:

- Aktivierung von Metalloproteinasen
- Freisetzung von Wachstumsfaktoren



Abbildung 7: Faktoren, die Kapillarwachstum initiieren (Factors initiating capillary growth).
 Übersetzt aus: Hudlicka O: Is physiological angiogenesis in skeletal muscle regulated by changes in microcirculation. *Microcirculation* 5, 7-23 (1998), Abb. 7; Lumen (L), Perizyt (P).

Das Kapillarwachstum in stimulierten Skelettmuskeln wird via zweier unterschiedlicher Prozesse erreicht: Zum einen durch abluminales Aussprossen und zum anderen durch longitudinales Teilen des Kapillarlumens (Splitting), wobei die beiden Schlüsselschritte Proteolyse der Basalmembran und Proliferation der Endothelzellen sind (74,111).

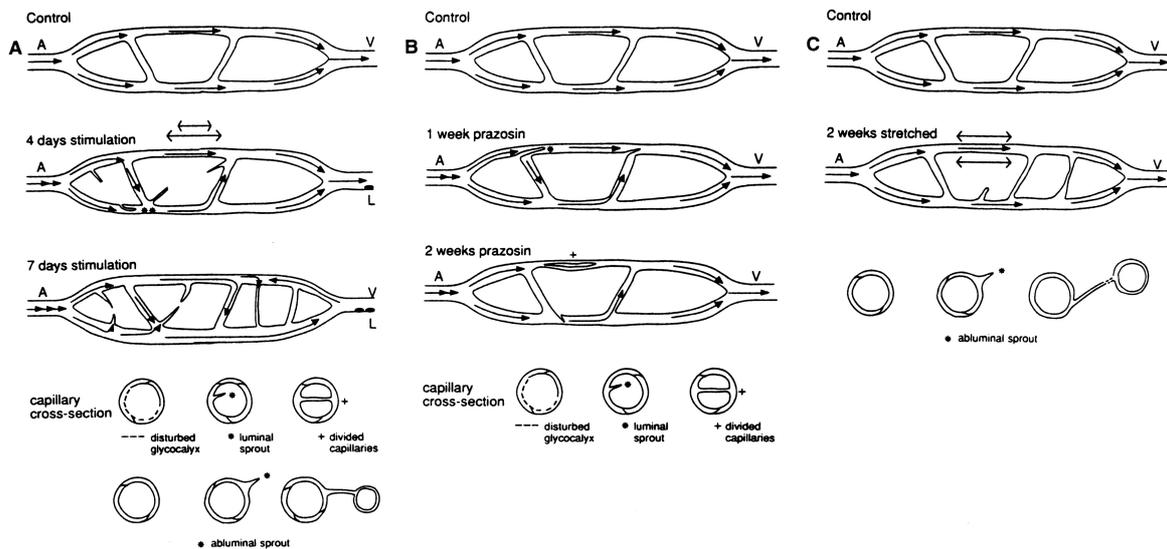


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Kapillarwachstums in elektrisch prästimulierten (A), mit Vasodilatoren (Prazosin) behandelten (B) oder Dehnung ausgesetzten Skelettmuskeln (C). Kapillarwachstum scheint in mit Prazosin behandelten Muskeln (B) durch longitudinales Teilen der Kapillaren erreicht zu werden, in Dehnung ausgesetzten Muskeln (C) durch abluminales Aussprossen. Bei prästimulierten Muskeln (A) treten beide Phänomene in Kombination auf (siehe jeweils capillary cross-section bzw. Kapillardurchmesser). Übernommen aus: Hudlicka O: Is physiological angiogenesis in skeletal muscle regulated by changes in microcirculation. *Microcirculation* 5, 7-23 (1998), Abb. 18

Der Blutfluss in kontrahierenden Muskeln nimmt um ein Vielfaches zu und erhöht sich während der Kontraktionsperiode besonders (78). Egginton und Hudlicka (42) beweisen sogar, dass der Blutfluss auch in der Ruhephase einer durch elektrische Stimulation erreichten Kontraktion in den Kapillaren erhöht bleibt und somit am Wachstum von neuen Kapillaren beteiligt ist. Kein Kapillarwachstum ist wiederum zu verzeichnen, wenn die versorgende Arterie ligiert wird (76). Die Applikation von blutfluss erhöhenden Medikamenten (z.B. Prazosin, α_2 -Blocker) führte auch zu verstärktem Kapillarwachstum (44,78).

Der erhöhte Blutfluss induziert durch luminale Teilung der Gefäße einen Anstieg der Kapillardichte (44). Hansen-Smith et al. (68) stellten elektronenmikroskopisch fest, dass es im Lumen von Kapillaren eines elektrisch stimulierten Muskels zu einer Bildung von Septen kommt, was dann zu einer Spaltung der Gefäße führt.

De Forrest und Hollis (38) berichteten, dass hohe Schubspannung in perfundierten Kaninchenaorten zu einer erhöhten biosynthetischen Aktivität von Endothelzellen führt. Langille (87) zeigte, dass erhöhte Schubspannung das Wachstum von Endothelzellen der Aorta fördert und Dewey et al. (41) beschrieben die Proliferation von Endothelzellen einer Aorta, nachdem sie als Gewebekultur einer Schubspannung ausgesetzt waren. Ähnliches berichteten Ando et al. (7): „Unter Einfluss von Schubspannung kommt es zur Migration und Proliferation von Endothelzellen“. Das Wachstum der Zellen korreliert hierbei mit der Intensität der Schubspannung. Milkiewicz et al. (99) untersuchten, ob es durch Zunahme des Blutflusses und damit der Schubspannung mit Hilfe von Prazosin zu einer Heraufregulierung der VEGF-Expression kommt. Gleiches wollten sie für elektrisch stimulierte Skelettmuskeln beweisen. In beiden Fällen konnte eine erhöhte VEGF-A-Zunahme gemessen werden. Auch Rivilis et al. (111) zeigten, dass als Resultat auf verstärkte Schubspannung im Lumen der Kapillaren vermehrt VEGF-Protein gebildet wird. Außerdem zeigte sich, dass auch Muskeldehnung, wofür die synergistischen Muskeln entfernt wurden, zu einer VEGF-Proteinerhöhung führt und die Bildung von Matrixmetalloproteasen induziert (43,44,111). Sie stehen in Zusammenhang mit der zur Neovaskularisierung erforderlichen Auflösung der Basalmembran (111).

Ein weiterer Faktor, der die Angiogenese zu induzieren vermag, ist die erhöhte Wandspannung. Durch den erhöhten Blutfluss kommt es zu einer Dilatation der Kapillaren, was folglich zu einer gesteigerten Wandspannung führt (57,73).

Folkman und Greenspan (52) sowie Folkman und Moscona (54) zeigten bei Gewebekulturen, dass durch erhöhte Wandspannung die Endothelzellen abgeflacht werden und so sensitiver auf Wachstumsfaktoren reagieren. Somit kann auch die erhöhte Wandspannung in Blutgefäßen als möglicher, die Angiogenese fördernder Faktor angesehen werden. Zu erwähnen ist noch, dass die elektrische Stimulation nicht nur zur Bildung neuer Kapillaren führt, sondern auch unausgereifte Arteriolen entstehen (Hansen-Smith et al. (67)) lässt.

1.2 Problemstellungen

Ziel dieser Arbeit ist, zu untersuchen, wie durch Elektrostimulation von Skelettmuskeln die Durchblutungsverhältnisse für muskuläre Herzunterstützungssysteme optimiert werden können. Diese Untersuchungen sollen am M. latissimus dorsi der Ziege vorgenommen werden. Die Grundlagen sollen im Hinblick auf die indirekte muskuläre Myokardrevaskularisation und muskuläre Blutpumpen betrachtet und im Vergleich mit den in der Literatur bekannten Ergebnissen diskutiert werden. Zusätzlich soll der Sauerstoffpartialdruck im elektrisch stimulierten Skelettmuskel bestimmt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

2.1.1 Auswahl

Für die Versuche wurden Burenziegen ausgewählt. Sie besitzen als Fleischziegen einen M. latissimus dorsi mit vermehrter Muskelmasse. Er ist bei Operationen gut zugänglich und ähnelt dem von Menschen sehr (siehe 2.1.2.). Für die Untersuchungen standen 6 Burenböcke zur Verfügung. Die Tiere hatten ein Alter zwischen 3 und 7 Jahren und ihr Körpergewicht betrug 60 bis 70 Kg.

Die Operationen, die Unterbringung und die pflegerische Versorgung erfolgten in der zentralen Tierhaltung des UK-SH Campus Lübeck. Die veterinärärztliche Überwachung erfolgte durch Herrn Dr. med. vet. R. Noel. Die Ziegen standen unter behördlicher Kontrolle eines Tierschutzbeauftragten des Regierungspräsidenten des Landes Schleswig-Holstein.



Abbildung 9: Ziegen im Freigelände der gemeinsamen Tierhaltung der Universität zu Lübeck.

2.1.2 Der Musculus latissimus dorsi beim Menschen und bei der Ziege

Der Musculus latissimus dorsi ist ein außerordentlich breiter und platter Muskel, der einen Großteil der dorsalen Rumpfwand bedeckt. Er hat seinen Ursprung an einer Aponeurose aus dem oberflächlichen Blatt der Fascia thoracolumbalis und den Dornfortsätzen der sechs unteren Brustwirbel, aller Lendenwirbel, der Hinterfläche des Os sacrum und dem Labium externum der Crista iliaca. Weiterhin können noch einige Zacken an der 9.-12. Rippe und am Angulus inferior des Schulterblattes entspringen. Die Fasern ziehen über den unteren Schulter-

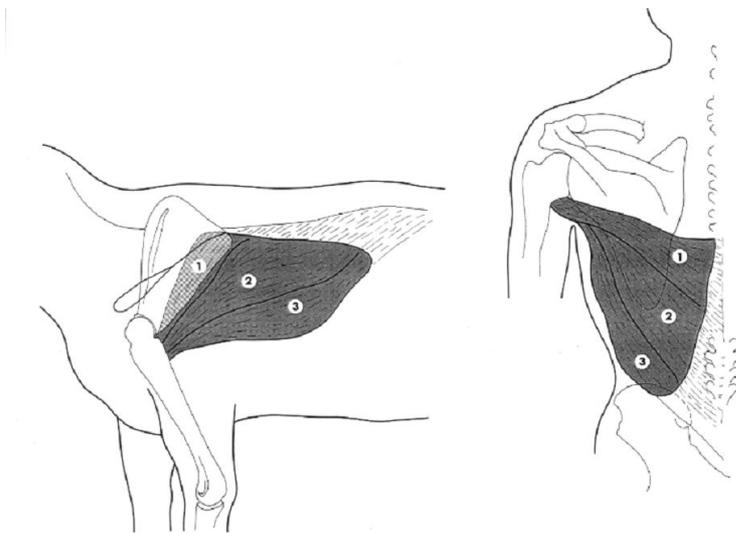


Abbildung 10: Topographie des Musculus latissimus dorsi bei Ziege (links) und Mensch (rechts) mit seinen drei Anteilen Pars transversa (1), Pars obliqua (2) und Pars lateralis (3).

blattwinkel (Angulus inferior) und setzen nach dem Übergang in eine platte Sehne um 180° verdreht vor dem Musculus teres major an der Crista tuberculi minoris humeri an (Abb. 10). Der M. latissimus dorsi kann Funktionen wie Innenrotation, Adduktion und Retroversion des Armes bewirken. Seine größte Wirkung entfaltet er bei eleviertem Arm (Ausholen

zum Hieb). Ähnliche Funktionen hat der Muskel auch bei der Ziege, nur ist er bei den Tieren nicht ganz so ausgeprägt. Der Muskel besteht bei beiden Spezies aus drei Anteilen, der Pars lateralis, der Pars obliqua und der Pars transversa. Im Tierversuch ließen sich nur die Pars lateralis und die Pars obliqua ausreichend für die morphologische und funktionelle Auswertung nutzen, da die Pars transversa fest mit dem Schulterblatt verwachsen ist. Die Durchblutung und die Innervation sind durch die Arteria und den Nervus thoracodorsalis gewährleistet.

2.2 Myostimulator, Stimulationsmuster und Elektroden

Eingesetzte Myostimulatoren

A. Für die Versuche wurde ein eigens von der Klinik für Herzchirurgie des UK-SH Campus Lübeck in Zusammenarbeit mit externen Entwicklern konstruierter elektrischer Schrittmacher eingesetzt. Mit diesem ließ sich das notwendige Stimulationsmuster erzeugen. Der M. latissimus dorsi soll intermittierend stimuliert werden, d.h. er wird abwechselnd eine Stunde lang stimuliert und ruht dann wieder eine Stunde. Hierfür ist dieser besondere Myostimulator notwendig, da ein herkömmlicher Muskelschrittmacher in solcher Weise nicht programmierbar ist.

Der M. latissimus dorsi einer Ziege soll nach folgendem Stimulationsmuster trainiert werden:

1. Stimulationsdauer/d : 12 h
2. Intermittierend : 1h on-1h off
3. Frequenz : 10 Hz
4. Spannung : 2-5 V
5. Pulsbreite : 300 µsec

B. Um den Belastungstest, während der Operation durchführen zu können (siehe 2.1.5.), reicht ein einfacher Myostimulator völlig aus (MEDTRONIC; Minneapolis; USA; Mod. Itrel, Nr. 7424).

Für den Belastungstest, der am prästimulierten und unstimulierten Muskel intraoperativ durchgeführt wurde (siehe 2.1.5.), ist folgendes Stimulationsmuster angewandt worden:

1. Stimulationsdauer : 10 min
2. on-time : 0,2 sec
3. off-time : 0,9 sec
4. Spannung : 5 V
5. Pulsbreite : 210 µsec
6. Pulsfrequenz : 33 Hz

Es werden hier 55 Kontraktionen pro Minute generiert (60sec/0,2sec on-time+0,9sec off-time =55).

Eingesetzte Elektroden

Es wurden in beiden Fällen temporäre Ventrikelelektroden zur Stimulation der Skelettmuskulatur verwendet (MEDTRONIC; Minneapolis; USA; Nr. 6492).

2.3 Operationsverfahren

Es wird wie folgt zweizeitig vorgegangen:

A. Schrittmacherimplantation

Vor Beginn des Eingriffs wird jedes Tier mit einer intramuskulären Injektion von 2 ml Xylazinhydrochlorid (Rompun®, BayerVital GmbH, Leverkusen, Deutschland) anästhetisiert. Bei erhaltener Spontanatmung wird der Hautschnitt am kaudalen Rand des M. latissimus dorsi durchgeführt. Zur Schrittmacherimplantation muss über der Muskelfaszie eine Tasche durch stumpfe Präparation geschaffen werden. Vor dem Einlegen des Myostimulators kommt es zum Einbringen der Stimulationselektroden im medialen Bereich des Muskels im rechten Winkel zu den Fasern. Es folgt der Wundverschluss.

B. Intraoperative funktionelle Messungen und Muskelprobenentnahme

Nach 14 Tagen erfolgt dann die Erhebung der intraoperativen funktionellen Messdaten und abschließend die Entnahme von Skelettmuskelproben. Diese Prozeduren werden zunächst am unstimulierten M. latissimus dorsi vorgenommen und im Anschluss am stimulierten.

Zur Narkoseeinleitung werden dem Tier 2 ml Xylazinhydrochlorid intramuskulär verabreicht. Zur orotrachealen Intubation wird ein herkömmlicher Endotrachealtubus (Größe 8 Ch.) benutzt. Die Gabe der Medikamente erfolgt über einen zentralen Venenkatheter. Die Blutdruckkontrolle erfolgte an einer Arterie des rechten Ohres. Die Herzfrequenz wurde über ein herkömmliches EKG abgeleitet. Zur Erhaltung der Narkose wird über einen Perfusor® ein Gemisch aus Ketamin (ratiopharm, Ulm, Deutschland; 10 ml, 500 mg) und Propofol 2% (Disoprivan®, GlaxoWellcome, Bad Oldeloe, Deutschland; 40 ml, 800 mg) verwendet, die injizierte Menge beträgt 20 ml/h.

Der M. latissimus dorsi wird bis auf seine Faszie freigelegt. Die Muskelfaszie muss eröffnet werden, um die Sonde zum Messen des Sauerstoffpartialdrucks im Muskelgewebe einführen zu können. Zunächst wird aber im proximalen Anteil des Muskels der Gefäß-Nerven-Strang mit Arteria, Vena und Nervus thoracodorsalis stumpf freipräpariert, um anschließend den Messkopf zur Erhebung des Blutflusses um die Arterie anbringen zu können. Hierauf kann der oben erwähnte Messkatheter (Sauerstoffpartialdruck) parallel zu den Muskelfasern eingebracht werden. Er wird im medialen Muskelabschnitt 1,5 mm tief ins Gewebe gelegt. Als letztes werden die Elektroden des Muskelschrittmachers für den Belastungstest in das Muskelgewebe eingenäht. Es folgt dann die Ruhewert-messungen des Blutflusses (ml/min) in der Arteria thoracodorsalis und die Messungen im Muskelgewebe, d.h. Messungen des Sauerstoffpartialdrucks (mmHg). Jetzt wird der M. latissimus dorsi mittels des Belastungsschrittmachers für 10 Minuten durch ein Stimulationsmuster 55 mal pro Minute zur Kontraktion gebracht. Währenddessen werden im Minutentakt die Messparameter für den Blutfluss und den Sauerstoffpartialdruck im Gewebe aufgezeichnet. Nach Beendigung des Belastungstests werden der Blutfluss und der Sauerstoffpartialdruck noch für weitere 15 Minuten in Ruhe jede Minute gemessen. 30 Minuten nach Belastung werden noch Abschlusswerte für den Blutfluss und den Sauerstoffpartialdruck aufgezeichnet. Während der gesamten Messungen wird darauf geachtet, dass der Muskel nicht auskühlt. Hierfür werden die Wundränder vorher mit Backhausklemmen adaptiert und man deckt das Operationsgebiet mit sterilen Bauchtüchern ab. Anschließend wird im medialen Bereich des Muskels eine 1x1 cm große Muskelprobe entnommen und nach Zerteilen in mehrere Stücke in frische Bouinsche-Lösung verbracht und das Operationsgebiet verschlossen.

2.4 Intraoperative Messungen

2.4.1 Messung des Blutflusses

Der Blutfluss (ml/min) in der A. thoracodorsalis wird mittels „Transit-Time Flowmetry“ bestimmt. Zuerst wird die Arterie im proximalen Anteil des Muskels palpatorisch aufgesucht und dann stumpf freipräpariert. Der sterile Messkopf (Flowprobe) zur Blutflussbestimmung wird um die Arterie platziert. Um eine Messung mit Ultraschall zu ermöglichen, muss dafür gesorgt werden, dass sich keine Luft zwischen Gefäßwand und Flowprobe befindet. Dies kann erreicht werden, indem man die Umgebung des Ultraschallmesskopfes am Blutgefäß mit Kochsalzlösung und sterilem Ultraschallgel umspült.

Folgende Messeinheiten wurden verwendet:

- Hauptmesseinheit mit Anzeigefeld für den momentanen Blutfluss (ml/min); Flowmeter T106 (TRANSONIC SYSTEMS INC.; Ithaca; USA)
- Flowprobe 2S (TRANSONIC SYSTEMS INC.; Ithaca; USA) für Blutgefäße mit einem Durchmesser von 1,5-2,0 mm; Auflösung 0,1 ml/min; Ultraschallfrequenz 3,6 MHz

2.4.2 Messung des Sauerstoffpartialdrucks

Zur Messung des pO₂ wird die Messsonde 1,5mm tief in das Muskelgewebe eingebracht. Der Sauerstoffpartialdruck wird im mittleren Bereich des M. latissimus dorsi erhoben.

Verwendete Geräte:

- Hauptmesseinheit mit Anzeigefeld für den pO₂ (mmHg); LICOX® (INTEGRA NEUROSCIENCE; New Jersey; USA)
- Messsonde; Licox® REF CC1, Länge 200 mm, Durchmesser 0,5 mm, pO₂-sensitive Fläche 7 mm²

2.5 Bestimmung der Kapillaranzahl pro Muskelfaser

2.5.1 Materialgewinnung

Die Muskelproben werden im medialen Bereich des M. latissimus dorsi entnommen. Hierbei handelt es sich um 1x1cm große Proben, die dann mit Hilfe eines Skalpell in mehrere 3 mm starke Muskelpräparate zerteilt werden. Es ist darauf zu achten, dass die Schnitfführung die Muskelfasern im queren Durchmesser trifft. Die Muskelpräparate werden umgehend in frischer Bouinscher Lösung fixiert.

2.5.2 Histologische Anfärbung

2.5.2.1 Fixierung

Zur Fixierung des histologischen Materials wird frische Bouinsche Lösung verwendet. Die Bouinsche Lösung setzt sich aus 75 ml gesättigter, wässriger Pikrinsäure und 25 ml 37%igem, filtriertem Formaldehyd zusammen. Vor Benutzung (bis maximal 2 Stunden vorher) gibt man dann 5 ml Eisessig zu. Die Fixierdauer richtet sich nach der Größe der Präparate, erfolgt aber mindestens für 24 Stunden bei Raumtemperatur.

2.5.2.2 Dehydrieren

In einem ersten Schritt muss das Gewebe in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol) vom 70%igen bis zum absoluten Alkohol entwässert werden. Vorher werden die Proben noch einmal bei Lupenvergrößerung zugeschnitten. Die Muskelproben werden jeweils 12 Stunden in 70%igem (3x), in 80%igem (1x), in 90%igem (1x) und abschließend in 100%igem (3x) Alkohol aufbewahrt. Danach erfolgt die Einbettung in Paraplast® (SHERWOOD MEDICAL; St. Louis; USA). Um im weiteren Verlauf die Morphologie des Gewebes korrekt beurteilen zu können, muss gewährleistet sein, dass die Muskelfasern exakt senkrecht zum Faserverlauf getroffen werden.

2.5.2.3 Einbetten

Um die Konsistenz des Gewebes bei der Herstellung der 5 µm starken Schnitte, wie es für die Lichtmikroskopie nötig ist, zu erhalten, wird Paraplast® zum Einbetten eingesetzt.

Als Erstes werden die entwässerten Muskelpräparate für 24 Stunden in Isopropanylalkohol (IPA) eingebracht, dann in ein Isopropanyl-Paraplast-Gemisch für 2-3 Tage. Schließlich folgt die Einbettung in reines Paraplast®, das wegen seines Schmelzpunktes im Bereich von 58-60°C bei 60°C im Brutschrank aufbewahrt wird. Die zum Schneiden benötigten Blöcke werden wie folgt hergestellt, reines Paraplast® wird in einen Ausgießrahmen gegossen, das mit Paraplast® getränkte Gewebestück wird hinzugefügt und mittels Pinzette orientiert. Die gewünschte Schnittfläche wird auf die Ausgießplatte gedrückt. Dann kühlen die Blöcke bei Raumtemperatur aus und die Ausgießrahmen können entfernt werden.

2.5.2.4 Schneiden und Entparaffinierung

Mit Hilfe eines Schneidegeräts (Autocut 1150; Reichert-Jung) wurden aus den gehärteten Paraffinblöcken 5µm starke Schnitte angefertigt. Damit die Schnitte mit einem Pinsel gestreckt werden können, wurden diese dazu in ein 37°C warmes Wasserbad überführt. Anschließend wurden sie auf einen Chromalaun-Gelatine beschichteten Objektträger gezogen, was ein Abrutschen bei der lektinhistochemischen Färbung verhindert. Die Objektträger wurden danach für mehrere Stunden bis Tage in einen Brutschrank verbracht, um bei 37°C trocknen zu können. Vor einer Färbung mussten die Schnitte entparaffiniert werden. Dies geschah mit Xylol (4x5 min), dann wurden sie mit einer absteigenden Alkoholreihe der folgenden Konzentrationen bis ins wässrige Milieu überführt (jeweils 5 min): 100%, 96%, 90%, 80%, 2x70%. Es folgte ein Bad in Aqua dest und dann ein Abspülen mit Leitungswasser für 30 Sekunden.

2.5.2.5 Färbung

Hier erfolgte das Färben mit Lektin (*Bandeiraea simplicifolia* (BS-1)).

Lektine sind Proteine nicht-immunologischer Herkunft, die eine spezifische Affinität zu Kohlenhydratgruppen von Glykoproteinen und Glykolipiden haben. Da sie in der Natur weit verbreitet sind, können sie aus Pflanzen, Tieren, Insekten und Mikroorganismen isoliert werden (124).

Durch Lektine kann man mit hoher Empfindlichkeit und Spezifität Zuckergruppen lokalisieren. Damit können verschiedene Strukturen auf Oberflächen, im Zytoplasma und in extrazellulärer Matrix identifiziert werden. Laitinen (86) zeigte, dass *Bandeiraea simplicifolia* (BS-1) sich zur Darstellung von Kapillaren in

Skelettmuskulatur, Herzmuskulatur und Gehirn eignet. BS-1 wird aus den Samen afrikanischer Bohnenpflanzen gewonnen. Wie es bei immunhistochemischen Techniken der Fall ist, kann die Adhäsion von Lektinen an Gewebeschnitten durch direkte Bindung mit einem Fluoreszenzfarbstoff, einem Enzym oder durch eine direkte Färbemethode mikroskopisch sichtbar gemacht werden. Um befriedigende Ergebnisse und Langlebigkeit der Färbung zu erzielen, wurde die sogenannte Avidin-Biotin-Methode angewandt. Dabei wurden Biotin gekoppeltes BS-1 und ein Extravidin®-Peroxidase-Komplex (Sigma-Aldrich; Deutschland) verwendet. Extravidin® ist ein modifiziertes Avidin. Es kommt als Glykoprotein in Eiklar vor und besitzt eine hohe Bindungsneigung mit Biotin. Die an Extravidin® gebundene Peroxidase wird durch eine Substrat-Chromogen-Reaktion sichtbar gemacht und damit auch der Lektinbindungsort. Um die physiologisch in Geweben vorkommenden endogenen Peroxidasen (z.B. in Leukozyten) zu blocken, wird vor dem Aufbringen des Extravidin®-Peroxidase-Komplexes das Präparat in ein H₂O₂-Bad verbracht. Für die Anfärbung wurde das Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) verwendet. Dies erzeugt ein tiefbraunes, langlebiges Reaktionsprodukt.

2.5.2.6 Die Methode umfasst folgende Grundschrirte:

1. Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität
2. Bindung des mit Biotin konjugierten Lektins BS-1 an Kohlenhydrategruppen der Endothelzellen der Kapillaren
3. Bindung des Extravidin®-Peroxidase-Komplexes an Biotin
4. Sichtbarmachen der Peroxidase mit DAB

2.5.2.7 Arbeitsschritte im Detail

Zum Spülen der Präparate wurde eine 0,01M phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) mit einem pH-Wert von 7,4 verwendet.

Die Stammlösung setzt sich wie folgt zusammen:

- 90 g NaCl
- 2,704 g NaH₂PO₄H₂O
- 28,294 g Na₂HPO₄ 12H₂O
- mit Aqua dest auf zwei Liter auffüllen

Zusammensetzung der TBS-Lösung:

- 242,28 g Tris(hydroxymethylmethan)aminomethan (SERVA; Heidelberg; Deutschland)
- 344,4 g NaCl
- In ca. 3,5 l Aqua dest lösen, nach Auflösen, den pH-Wert mit konzentrierter Salzsäure auf 7,6 einstellen
- Auffüllen auf 4 l
- Bei 4°C aufbewahren

Zusammensetzung der TBS-Tween-Lösung:

- 100 ml TBS-Lösung mit 900 ml Aqua dest versetzen und 5%ige Tween-20-Lösung (SERVA; Heidelberg; Deutschland) hinzufügen

Verdünnung des BS-1-Biotin:

- BS-1-Biotin mit Antibody Diluent (ZYMED; San Francisco; USA) im Verhältnis 1:120 verdünnen

Verdünnung des Extravidin®-Peroxidase-Komplexes:

- Extravidin®-Peroxidase-Komplex mit Antibody Diluent (ZYMED; San Francisco; USA) im Verhältnis 1:60 verdünnen

Die Substrat-Chromogen-Lösung (DAB) wird kurz vor Gebrauch angesetzt:

- 250 mg DAB werden mit 10 ml TBS (pH 7,6) versetzt
- Das Gemisch (DAB+TBS) portioniert (160 µl) einfrieren
- Vor Gebrauch unter Abzug auftauen, dann die 160 µl DAB mit 4 ml TBS-Tween und 80 µl 1%iger H₂O₂-Lösung versetzen, anschließend unverzüglich verbrauchen (s.u.)

Die Lösung wird in einem 10 ml Röhrchen gut geschüttelt, die Niederschläge werden mit Watte herausgefiltriert.

Bei Raumtemperatur erfolgt dann die Behandlung der Schnitte:

- a. Mit Aqua dest für 5 min spülen

- b. Blockierung der endogenen Peroxidasen für 5 min in einem Bad mit:
 - 20 ml Methanol
 - 20 ml 30%iges H₂O₂
 - 160 ml Aqua dest
- c. Spülen mit Aqua dest für 5 min
- d. Spülen mit PBS-Lösung (pH 7,4) für 5 min
- e. Zugabe von 100 µl BS-1-Biotin (Verdünnung 1:120) pro Schnitt mittels einer Eppendorf®-Pipette

Die Objektträger verbleiben anschließend über Nacht in einer feuchten Inkubationskammer bei Raumtemperatur.

- f. Nachfolgend Spülen mit PBS für 5 min
- g. Zugabe von 100 µl Extravidin®-Peroxidase-Komplex (in Verbünnungspuffer 1:60) pro Schnitt mittels einer Eppendorf®-Pipette
- h. Inkubation in einer feuchten Kammer für 60 min
- i. Abspülen mit PBS für 5 min

Nach frischer Herstellung der DAB-Lösung:

- j. Zugabe von 100 µl DAB-Lösung pro Schnitt mittels Eppendorf®-Pipette
- k. Inkubation für 10 min unter mikroskopischer Kontrolle
- l. Stoppen der Farbreaktion mit PBS, wenn die Kapillaren ausreichend kräftig gefärbt sind und der Hintergrund noch blass ist
- m. Abspülen mit PBS für 5 min
- n. Kurzes Spülen mit Aqua dest
- o. Eindecken mit Aquatex® (MERCK; Darmstadt; Deutschland)

2.5.3 Mikroskopische Auswertung

2.5.3.1 Vorbemerkungen

Unterstützt durch eine semiautomatische Analyse wurden die Muskelpräparate lichtmikroskopisch ausgewertet. Hierfür wurden folgende Geräte verwendet:

- ZEISS Universal Lichtmikroskop mit manuell verschiebbarem Objektisch
- Zeichenspiegel (am Mikroskop justiert)

- IDMS (Interaktives Digitizer Messsystem, ANWENDUNSSYSTEME SOMMER; Haag/Amper; Deutschland) mit einem Digitalisiertablett und Cursor (Mouse)
- Personal Computer mit Microsoft Windows Software (Version 3.0)

2.5.3.2 Zur Funktion des Messsystems

Über den Zeichenspiegel wird ein Lichtpunkt, der von einer am Cursor (Mouse) befindlichen Lichtquelle stammt, in das Okular projiziert, mit dem das auf dem Objektisch liegende Präparat betrachtet wird. Durch Bewegung des Cursors können die einzelnen Kapillaren und Muskelfasern unter Sichtkontrolle mit dem Lichtpunkt umfahren werden. Die Mouse bewegt man auf einem Digitalisiertablett. Dieses Tablett nimmt die Koordinaten der umrandeten Konturen wahr und überträgt sie in den PC. Aus ihnen werden frei wählbare Parameter berechnet (u.a. Flächen, Querschnitte, Länge) und auf der Festplatte gespeichert.

2.5.3.3 Durchführung

Das Skelettmuskelpräparat wurde in einer 400-fachen Vergrößerung ohne Ölimmersion betrachtet. Das Messfeld bestand aus vier Zeilen und vier Reihen. Um Doppelerfassungen zu vermeiden, wurde die Regel der „verbotenen Linien“ beachtet („unbiased profile counting“ nach Gundersen, 1971). Außerdem wurde das Objekt mäanderförmig durchfahren, d.h. der Objektisch wurde nach jeder Auszählung eines Messfeldes drei Messfelder in horizontaler Richtung und zwei Messfelder in vertikaler Richtung verschoben. Es wurden pro Präparat 20 Felder ausgewertet. Die Messung begann an einer willkürlichen Stelle im Objekt.

2.5.3.4 Bestimmung der Vergrößerung

Mit Hilfe des Objektmikrometers und eines auf dem Digitalisiertablett liegenden Lineals konnte die messtechnische Vergrößerung zwischen Präparat und Messtablett berechnet werden. Es lag eine 910-fache optische Vergrößerung vor.

2.5.3.5 Erfassung der Messdaten

Das IDMS speicherte Daten über die Anzahl der Kapillaren und Muskelfasern. Damit die gespeicherten Urdaten den tatsächlichen Größen entsprechen, musste die optische Vergrößerung (910-fach) berücksichtigt werden. Dazu wurden die Urdaten in Microsoft Excel übertragen und dort berechnet. Mit Hilfe des Programms wurde schließlich auch das Verhältnis Kapillaren zu Fasern (C/F-

Ratio) bestimmt, deren Anzahl pro mm² sowie die Mittelwerte ihrer Querschnittsfläche in µm und ihr maximaler Durchmesser in µm.

2.6 Statistische Verfahren

Alle erhobenen Daten sind unter Zuhilfenahme des Programms WinStat (Version 2001.1) statistisch untersucht worden. Zunächst wurde überprüft, ob die Daten einer Gaußschen Normalverteilung entsprechen. Hierzu wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test durchgeführt. Besonders für die Daten der Kapillaranzahl pro Faser im MLD zeigt sich, dass sich die errechneten Werte einer Normalverteilung annäherten, sich aber noch unterhalb des geforderten Signifikanzniveaus von $p \geq 0,95$ befanden. Somit musste die Gruppe der unstimulierten Muskeln und die der prästimulierten mittels nicht-parametrischer Tests verglichen werden.

Da wir in allen Fällen einen Vergleich des unstimulierten mit dem prästimulierten Muskel eines Tieres vornehmen, liegen gepaarte Stichproben vor. Deshalb ist der nicht-parametrische Wilcoxon-Test verwendet worden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen international veröffentlicht werden. Deshalb werden alle Daten gemäß dem internationalen Gebrauch mit Mittelwert und Standardabweichung abgebildet, weil andere Darstellungen unüblich sind.

3 Ergebnisse

3.1 Tiere

Alle Burenziegen haben den Versuch überlebt. Während der Versuchsdurchführung waren alle Tiere gesund. Sie wurden jeweils während der 14-tägigen Stimulationphase im Tierstall gehalten.

3.2 Blutfluss

Die Ermittlung des Blutflusses (ml/min) mit einem Flowmeter während und nach Belastung an der Arteria thoracodorsalis erfolgte bei fünf Burenböcken am unstimulierten Muskel (B_1, B_{3-6} ; $n=5$) und am kontralateralen prästimulierten (B_1, B_{3-6} ; $n=5$). Schon intraoperativ war aufgefallen, dass die Arteria thoracodorsalis eines prästimulierten Musculus latissimus dorsi einen um etwa 0,5-1 mm stärkeren Durchmesser aufwies.

Der aus drei Werten gemittelte Ruheblutfluss lag durchschnittlich auf der unstimulierten Seite bei $5,1 \pm 2,8$ ml/min und auf der prästimulierten bei $5 \pm 2,4$ ml/min und unterschied sich nicht signifikant ($p \geq 0,05$; Tab. 2+3).

Der Blutfluss in der Arteria thoracodorsalis des prästimulierten Muskels lag erst während des Belastungsversuches höher als auf der unstimulierten Seite. Er war absolut gesehen unter Belastung im unstimulierten um das 2,8-fache ($p \leq 0,05$) und im prästimulierten um das 5,4-fache ($p \leq 0,05$) in Bezug auf den Ruhewert erhöht (Abb. 11+12, Tab. 5+6). Der maximale Anstieg der Blutflusswerte wurde in den letzten drei Minuten unter Belastung evaluiert und zu einem Mittelwert zusammengefasst. Dieser wurde dann mit den entsprechenden Ruhewerten verglichen. Unter Belastung lag der Blutfluss im Mittel bei $19,9 \pm 0,9$ ml/min auf der unstimulierten und bei $30,2 \pm 2,7$ ml/min auf der prästimulierten Seite. Somit lag auf der stimulierten Seite ein 52% höherer Blutfluss vor ($p \leq 0,01$, Tab. 4). Um eine bessere vergleichende Darstellbarkeit (geringere Streuung) unter den einzelnen Tieren zu erreichen, wurden die Messwerte in relative Daten umgerechnet, d.h. der jeweilige Messwert einer Datenreihe wurde immer auf seinen Ausgangswert bezogen und prozentual [%] angegeben. Im Durchschnitt lässt sich in den unstimulierten Muskeln eine Blutflusssteigerung bezogen auf den Ruheblutfluss von $285 \pm 15,6\%$ (Tab. 9) errechnen, d.h. von $5,1 \pm 2,8$ auf $19,9 \pm 0,9$ ml/min (Tab. 2+4). Der Blutfluss stieg in der Arteria thoracodorsalis der prästimulierten Muskeln

von $5 \pm 2,4$ auf $30,2 \pm 2,7$ ml/min ($480,4 \pm 42\%$, Tab. 3+4, Tab. 9). Diese relativen Daten sind als Summenkurven der Mittelwerte mit ihrer Standardabweichung in der Abbildung 13 dargestellt. Nach der Erholungsphase, die sich an die Belastungsstimulation anschloss, erreichten die Blutflusswerte aller Muskeln fast ihr Ausgangsniveau. Die Absolutwerte und die auf den Ausgangswert normierten relativen Daten, der unstimulierten und prästimulierten stimulierten Skelettmuskeln sind aus den Tabellen im Anhang zu entnehmen (Tab. 2-9).

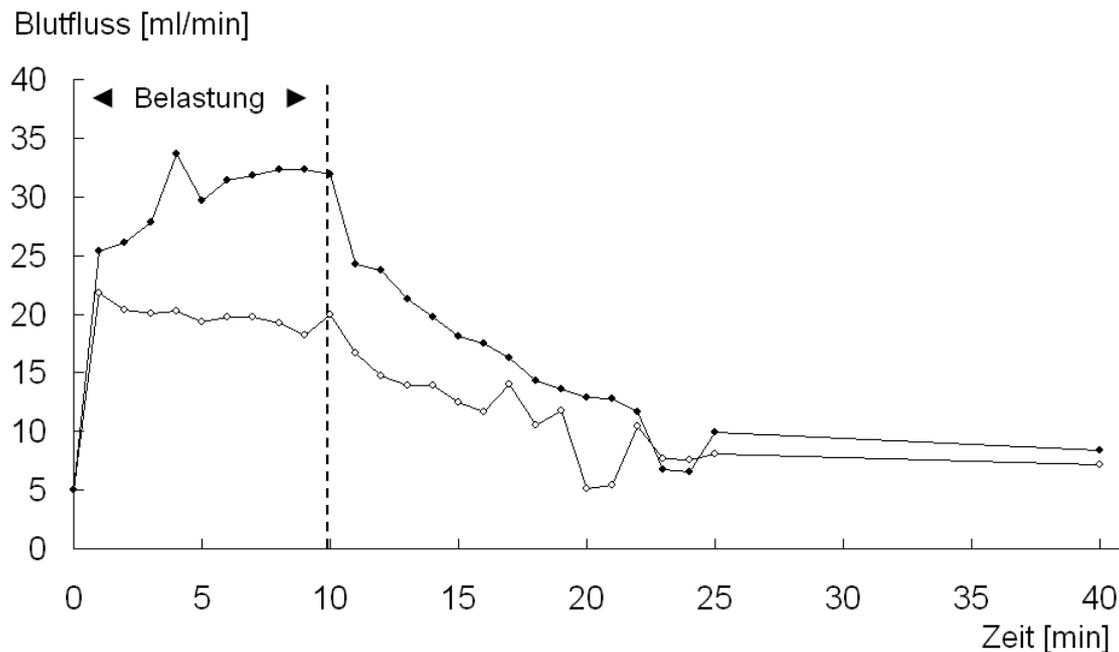


Abbildung 11: Summenkurve der Mittelwerte (Absolutwerte) des Blutflusses [ml/min] in der Arteria thoracodorsalis des unstimulierten ($n=5$, heller Punkt) und prästimulierten ($n=5$, dunkler Punkt) Musculus latissimus dorsi während und nach Belastung.

Blutfluss [ml/min]

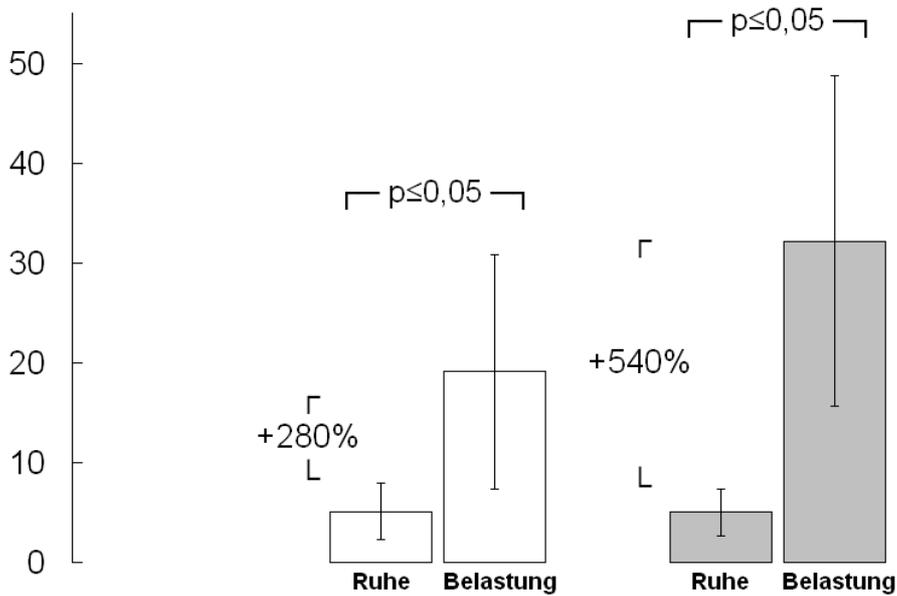


Abbildung 12: Blutfluss [ml/min] im unstimulierten (weiße Blöcke, n=5) und prästimulierten (graue Blöcke, n=5) Musculus latissimus dorsi in Ruhe und unter Belastung mit Darstellung der Mittelwerte und deren Standardabweichung. Signifikanzniveau $p \leq 0,05$.

Blutfluss [%]

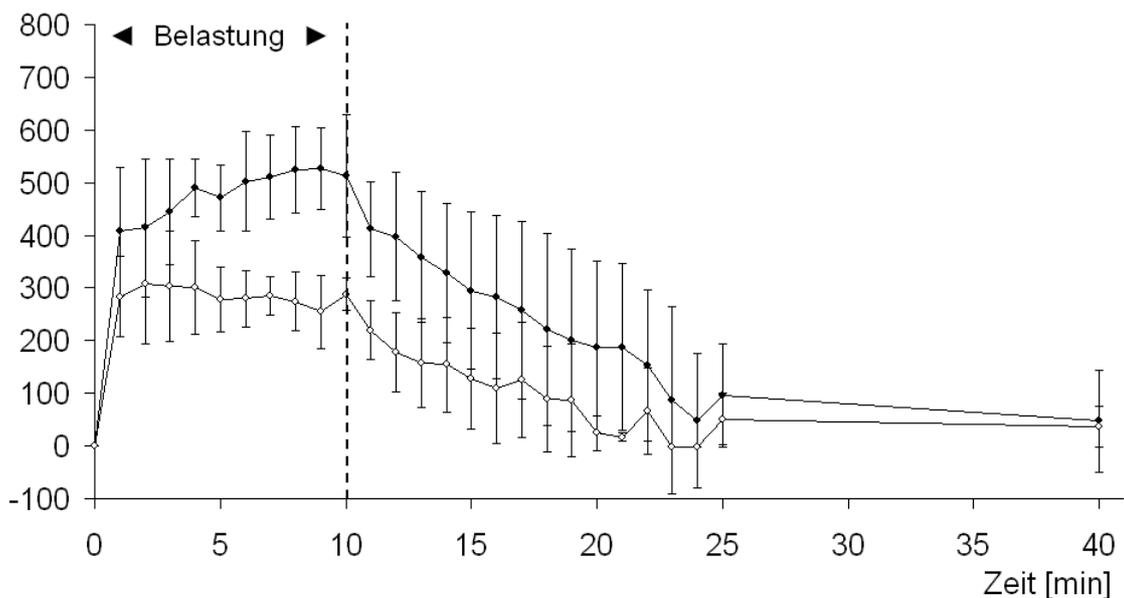


Abbildung 13: Summenkurve des auf den Ausgangswert normierten Blutflusses [%] in der Arteria thoracodorsalis des unstimulierten (n=5, heller Punkt) und prästimulierten (n=5, dunkler Punkt) Musculus latissimus dorsi während und nach Belastung. Angabe des Mittelwertes für Blutfluss [%] mit Standardabweichung.

3.3 Sauerstoffpartialdruck

Der Sauerstoffpartialdruck (pO_2 ; mmHg) während und nach Belastung konnte für fünf Tiere (B_{1-3} , B_{5+6} ; $n=5$) im unstimulierten Muskel und für drei Tiere (B_{3+5-6} ; $n=3$) im prästimulierten ermittelt werden.

Wenn man die Mittelwerte der beiden Datenreihen miteinander vergleicht, nimmt der Ruhesauerstoffpartialdruck im Gewebe des prästimulierten Musculus latissimus dorsi höhere Werte an als in der unstimulierten Muskulatur. Für die unstimulierten Muskeln lag er bei $15,4 \pm 7,5$ mmHg und für die prästimulierten bei $23 \pm 8,3$ mmHg (Tab. 10+11). Dieser Unterschied ist nicht signifikant ($p \geq 0,05$). Der Ruhewert des Sauerstoffpartialdrucks eines jeden Tieres wurde aus drei Einzelwerten gemittelt.

Aus der Summenkurve (Abb. 15) kann man ablesen, wie sich die intraoperative Belastungsstimulation in den ersten 10 Minuten auf den Sauerstoffpartialdruck im Gewebe der un- und prästimulierten Muskeln auswirkte. Der Sauerstoffpartialdruck war - absolut gesehen - unter Belastung im unstimulierten im Vergleich zum Ruhewert um 34% erhöht (nicht signifikant, $p \geq 0,05$, Abb. 14, Tab. 13) und im prästimulierten im Vergleich zum Ruhewert um 11% erniedrigt (nicht signifikant, $p \geq 0,05$, Abb. 14, Tab. 14). Der maximale Anstieg des Sauerstoffpartialdrucks wurde in den letzten drei Minuten unter Belastung evaluiert und zu einem Mittelwert zusammengefasst.

Um auch hier eine bessere vergleichende Darstellbarkeit unter den einzelnen Tieren zu erreichen, wurden die Messdaten als relative Werte angegeben. Sie sind als Summenkurven der Mittelwerte mit ihrer Standardabweichung in der Abbildung 15 dargestellt. Betrachtet man die relativen Daten, kam es unter den prästimulierten Muskeln im Mittel (Minute 1-10) zu einem Abfall des pO_2 um 27% (Tab. 17). Der pO_2 in der unstimulierten Muskulatur erhöhte sich im Mittel (Minute 1-10) während der Belastungsstimulation um 23% (Tab. 17). Nach einer Ruhephase erreichten die Messwerte fast ihre Ausgangswerte (Abb. 15). Die Absolutwerte und die auf den Ausgangswert normierten relativen Daten der unstimulierten und stimulierten Skelettmuskeln, sind aus den Tabellen im Anhang zu entnehmen (Tab. 10-17).

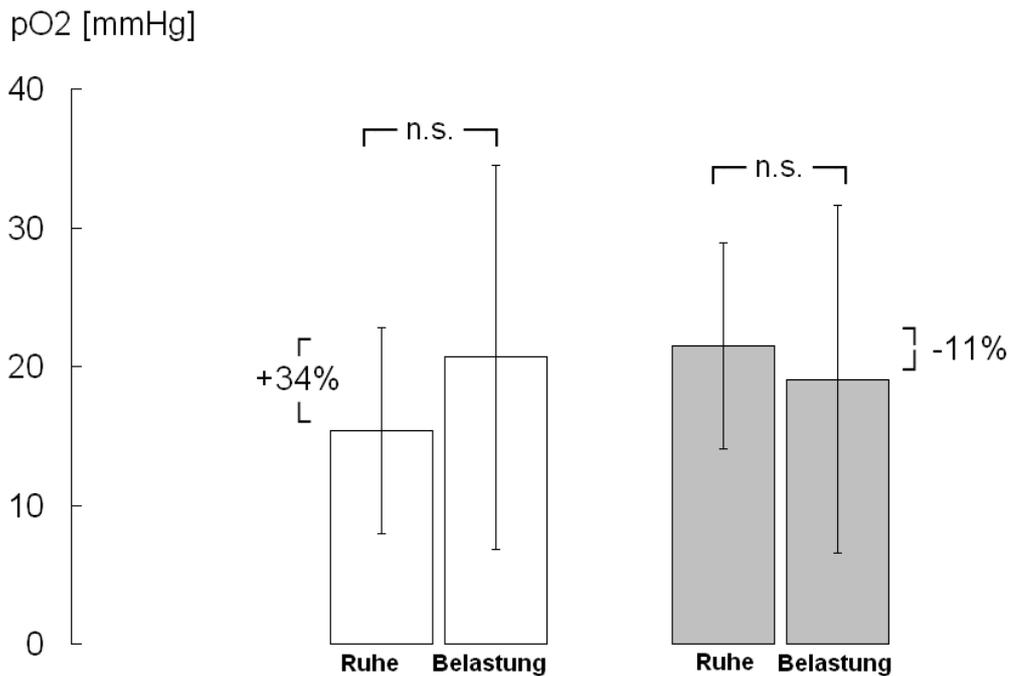


Abbildung 14: Sauerstoffpartialdruck [mmHg] im unstimulierten (weiße Blöcke; n=5) und prästimulierten (graue Blöcke; n=3) Musculus latissimus dorsi in Ruhe und unter Belastung mit Darstellung der Mittelwerte und deren Standardabweichung (n.s.=nicht signifikant).

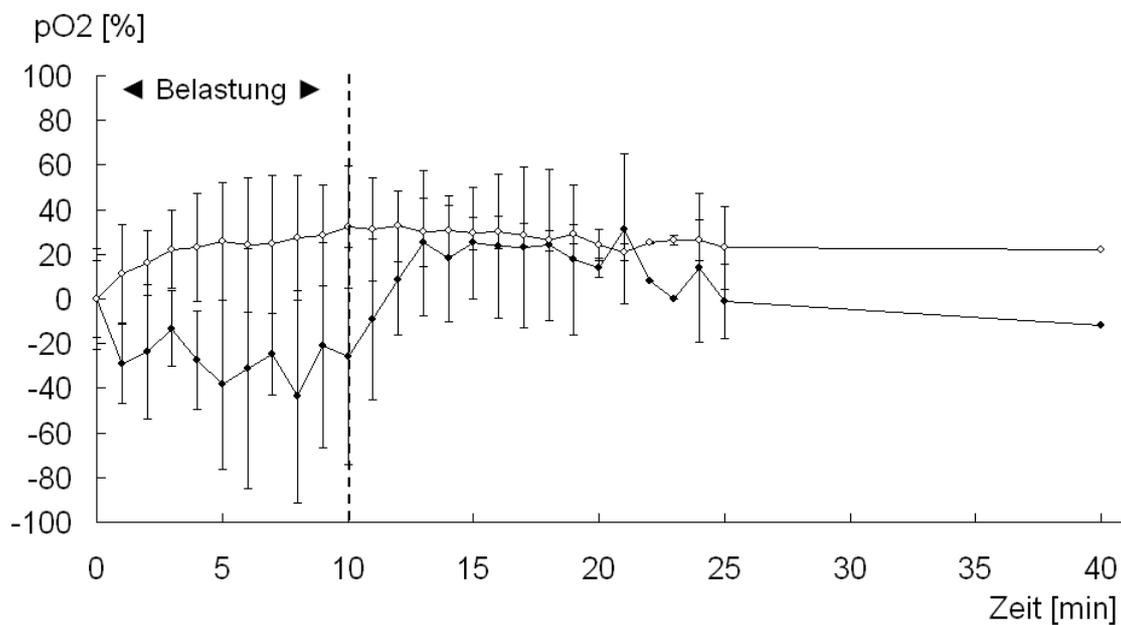


Abbildung 15: Summenkurve des auf den Ausgangswert normierten Sauerstoffpartialdrucks [%] im Gewebe des unstimulierten (n=5, heller Punkt) und prästimulierten (n=3, dunkler Punkt) Musculus latissimus dorsi während und nach Belastung. Angabe des Mittelwertes mit Standardabweichung.

3.4 Kapillaranzahl pro Muskelfaser

Die Auszählung der Kapillaranzahl pro Muskelfaser (C/F=capillary-to-fibre-ratio) im unstimulierten und prästimulierten Musculus latissimus dorsi konnte aufgrund fixationsbedingter Probleme im histologischen Schnitt nur bei fünf Tieren (B₁, B₃₋₆; n=5) vorgenommen werden.

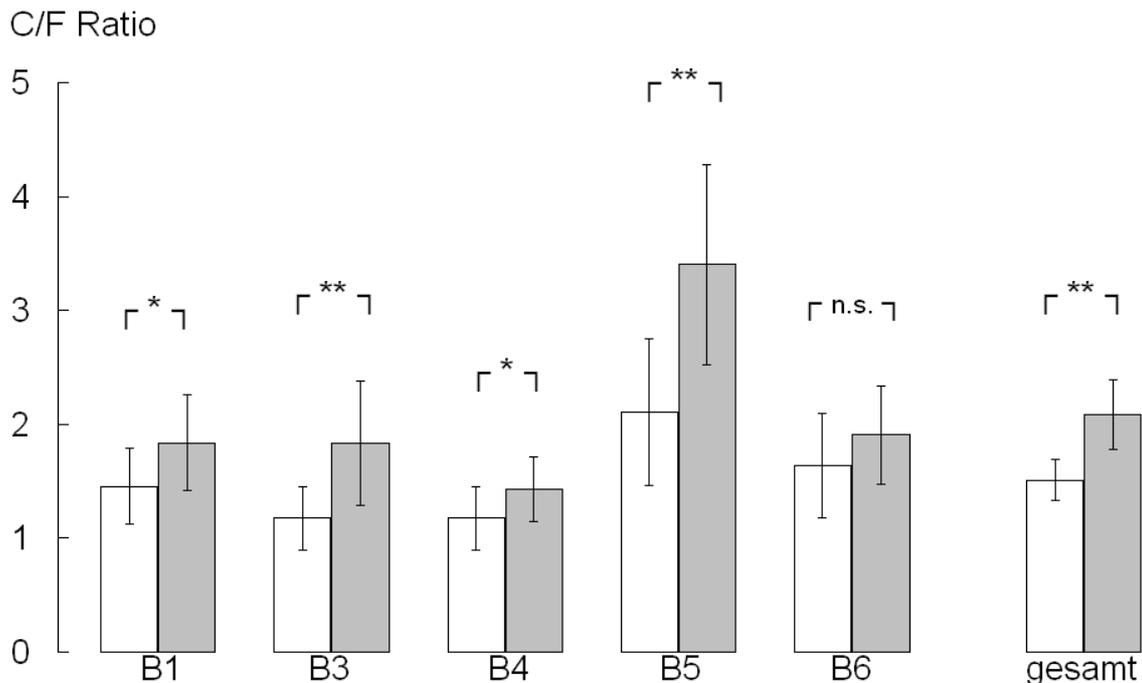


Abbildung 16: Kapillaranzahl pro Muskelfaser (C/F=capillary-to-fibre-ratio) im unstimulierten (weißer Block) und prästimulierten (grauer Block) Musculus latissimus dorsi und des Gesamtdurchschnitts (n=5) unter Angabe der Mittelwerte (Block) und ihrer Standardabweichung. Signifikanzniveau * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; n.s. = nicht signifikant.

Der statistische Vergleich zwischen unstimuliertem und prästimuliertem Skelettmuskel konnte bei Ziege B₁ und B₄ eine signifikante ($p \leq 0,05$) Erhöhung der Kapillaranzahl pro Muskelfaser belegen. In der Muskulatur des Tieres B₁ stieg die Kapillaranzahl von $1,5 \pm 0,3$ auf $1,8 \pm 0,4$, im Tier B₄ von $1,2 \pm 0,3$ auf $1,4 \pm 0,3$. Im Fall der Tiere B₃ und B₅ weist dieser statistische Vergleich sogar eine hochsignifikante Erhöhung nach ($p \leq 0,01$). In der Muskulatur des Tieres B₃ stieg die Kapillaranzahl von $1,2 \pm 0,3$ auf $1,8 \pm 0,5$, im Tier B₅ von $2,1 \pm 0,6$ auf $3,4 \pm 0,9$. Für Tier B₆ konnte kein signifikanter Unterschied ermittelt werden.

Die größte Steigerung der Kapillaranzahl pro Muskelfaser zeigte Tier B₅ mit einer Zunahme um 61% ($p \leq 0,01$). Im Durchschnitt erhöhte sich die Kapillaranzahl pro Muskelfaser von $1,5 \pm 0,2$ auf $2,1 \pm 0,3$. Somit lag durchschnittlich eine Vermehrung der Kapillaranzahl um 38% vor ($p \leq 0,01$). In Abbildung 16 ist die Erhöhung der

Kapillaranzahl pro Muskelfaser graphisch dargestellt. Die zugehörigen Daten kann man aus Tabelle 20 im Anhang entnehmen.

4 Diskussion

4.1 Tiere

Für diese experimentelle Arbeit wurden aus folgenden Gründen Burenziegen ausgewählt:

1. Insbesondere bei Burenböcken mit einem Gewicht von 70-100 kg und einem großen, breiten Rückenmuskel wie beim Menschen sind die experimentellen Ergebnisse weitgehend auf klinische Größenverhältnisse zu übertragen.
2. Als Fleischziegen haben sie eine kräftige Muskulatur. Der MLD von Burenböcken mit 300-400 g (im Gegensatz zum MLD von Weibchen mit 200-250 g) kommt dem humanen MLD mit 600 g ziemlich nahe. Insbesondere dann, wenn man bedenkt, dass die Muskelmasse bei herzinsuffizienten Patienten häufig deutlich verringert ist.
3. Die Faserzusammensetzung bei Ziegen - von Typ 1- zu Typ 2-Fasern mit 25% zu 75% - stimmt im Gegensatz zu derjenigen vom Schwein, Kalb oder Hund mit der des Menschen weitgehend überein (31,79).
4. Für Langzeitversuche mit wiederholten Messungen sind diese gutmütigen Tiere besonders geeignet.

4.2 Blutfluss

In der vorliegenden Studie ist der Blutfluss (ml/min) in der Arteria thoracodorsalis des unstimulierten und prästimulierten Musculus latissimus dorsi in Ruhe und unter Belastung mit einer Ultraschallsonde direkt am Gefäß gemessen worden. Dies ist eine bewährte Methode, Aussagen über die Gesamtdurchblutung des Muskels zu treffen. Dieses Verfahren lässt sich auch klinisch gut durchführen. Direkte Durchblutungsmessungen des Gewebes des Muskels (61) ergeben zwar reproduzierbare, regionale Ergebnisse, aber bei unserer Fragestellung kam es auf die Gesamtdurchblutung des Muskels an.

Overgoor und Barron (12,102) stellten fest, dass der Ruheblutfluss des prästimulierten Muskels im Gegensatz zum unstimulierten erhöht war. In unseren Untersuchungen zeigte sich dies allerdings nicht, der durchschnittliche Ruheblutfluss war nahezu gleich. Allerdings war der Blutfluss in der prästimulierten Muskulatur in unseren Untersuchungen während der Belastung um 52% höher als in der unstimulierten ($p \leq 0,01$; Tab. 4). Da der Blutfluss nur unter

Belastung erhöht war, scheint ein prästimulierter Muskel vor allem von Nutzen zu sein, wenn er aktiviert ist.

Überträgt man diese Befunde auf die Kardiomyoplastik und intrathorakale Muskelpumpen (Biomechanisches Herz oder Aortomyoplastik), werden diese wahrscheinlich auch im aktiven Zustand besser oxygeniert und Metabolite (z.B. Laktat) und CO₂ können schneller abtransportiert werden.

Auch für die indirekte Myokardrevaskularisation bedeutet dies, dass der ischämische Herzmuskel von den verbesserten Blutflusseigenschaften eines prästimulierten Muskels profitiert, wenn dieser zusätzlich im Bedarfsfall elektrisch zur Kontraktion gebracht wird.

Es ist zu erwarten, dass sich durch diese Prästimulation mit Eröffnung der Kollateralen vom proximalen zum distalen MLD ein einfacheres operatives Vorgehen als die von Beyer et al. beschriebene Methode (siehe 1.1.1.) anwenden lässt. Beyer musste ein freies Transplantat mit mikrochirurgischem vaskulären Wiederanschluss verwenden. Da das distale Drittel des MLD infolge einer Ischämie nicht verwendbar war, war der Muskel zu kurz, um ihn direkt auf dem Myokard zu platzieren. Somit musste das freie Transplantat an die A. mammaria mikrochirurgisch angeschlossen werden. Durch die Prästimulation hingegen, weist dieses distale Gewebe einen höheren Blutfluss und eine höhere Kapillaranzahl pro Muskelfaser auf und so könnte eine Ischämie nach Mobilisation des Muskels im distalen Bereich verhindert werden. Der Muskel steht somit in seiner vollen Ausdehnung zur Verfügung. Im gleichen Sinne zeigten Tang et al. (132,133) an einem prästimulierten M. latissimus dorsi von Schafen, dass es zur guten Perfusion im distalen MLD-Drittel kam, sodass der Muskel in seiner vollen Ausdehnung nutzbar erschien.

Wie ist nun aber der erhöhte Blutfluss während Belastung im prästimulierten Muskel zu erklären?

Bei erhöhtem Metabolismus kommen zwei vaskuläre Mechanismen in Betracht: Eine Kollateraleröffnung und eine erhöhte Kapillaranzahl pro Muskelfaser. Salmons et al. (116) zeigten, dass Kollateralen zwischen beiden Gebieten der Blutversorgung des Musculus latissimus dorsi (MLD) nach Prästimulation existieren. Das heißt: gefärbte Kunststoffpartikel wie auch Blut konnten über die A. thoracodorsalis und anschließend über Kollateralen vom proximalen Gewebe bis in die Peripherie des distalen Gefäßbettes im MLD nach Ligatur der übrigen

Gefäßversorgung gelangen. Wie oben beschrieben, erhöht sich der Blutfluss im distalen Muskelanteil besonders bei prästimulierten Muskeln (132,133). Somit scheint die Prästimulation zu einer Öffnung der Kollateralen zu führen. Diese Kollateralen scheinen sich aber besonders im aktivierten Muskel auf den Blutfluss auszuwirken, da der Ruheblutfluss in unseren Untersuchungen im un- und prästimulierten Muskel nahezu gleich war.

Durch die Prästimulation ist auch die Kapillaranzahl pro Muskelfaser im Mittel um 38% ($p \leq 0,01$; Tab. 20) angestiegen, was die gesamte, kapilläre Querschnittsfläche vergrößert und somit den Blutfluss signifikant steigert.

Da der zusätzlich erhöhte Blutfluss nur unter Belastung zu erheben ist, sollte ein

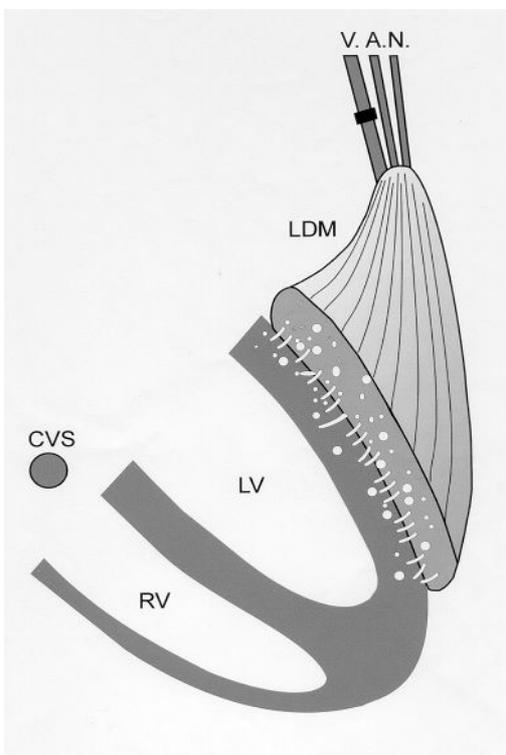


Abbildung 17: Indirekte Myokardrevaskularisation mit einem gestielten Musculus latissimus dorsi. Musculus latissimus dorsi (LDM), Arteria (A), Vena (V) und Nervus (N) thoracodorsalis, rechter (RV) und linker Ventrikel (LV), Sinus venosus (CVS). Verschluss der Vena thoracodorsalis durch Katheterembolisation (schwarzer Balken über Vene).

prästimulierter Muskel, der zur Herzunterstützung eingesetzt wird, während seines Einsatzes elektrisch stimuliert werden. Setzt man den Skelettmuskel zur IMR (indirekte Myokardrevaskularisation) ein, ist zu bedenken, dass nicht der komplette Blutfluss auf den Herzmuskel übergehen wird, da ein Teil des Blutes möglicherweise den prästimulierten Muskel durch die vorhandene Vena thoracodorsalis verlässt (Steal Effect). Beyer et al. (persönliche Auskunft, nicht veröffentlicht) haben während der klinischen Erprobung der IMR aber festgestellt, dass es bei einem Patienten im Verlauf zu einer Thrombose der abführenden Vene des Transplantats gekommen war. Der transplantierte Muskel hat dabei aber keinen Schaden genommen und die Funktion der Revaskularisierung des Myokards blieb erhalten. Es sollte somit experimentell geprüft werden, ob man den Verschluss der Vene therapeutisch herbeiführen kann (Abb. 17), wie zum Beispiel durch eine Katheterembolisation.

4.3 Sauerstoffpartialdruck

Der Sauerstoffpartialdruck wurde bei unseren Untersuchungen im mittleren Drittel des unstimulierten und prästimulierten Musculus latissimus dorsi (MLD) in Ruhe und unter Belastung in der Annahme gemessen, dass an diesem Ort vergleichbare Durchblutungssituationen zu erwarten sind, wie es Salmons et al. beschreiben haben (116). Aus Studien von Barron et al. (12,13) ist bekannt, dass der Sauerstoffpartialdruck in Ruhe im distalen Anteil des MLD niedriger liegt als im proximalen. Bei Barron führte eine intraoperative Belastungsstimulation nur im distalen Bereich des prästimulierten Muskels (MLD) zu einem Absinken des Sauerstoffpartialdrucks. Im proximalen MLD hingegen kam es zu einem Anstieg. Allerdings wurden hier die Muskeln vor der Belastungsstimulation im distalen Anteil mobilisiert und so der Blutzufuhr unterbrochen. Diese Mobilisierung ist nach Meinung von Barron et al. ein Risiko bei der Verwendung des MLD im Rahmen Kardiomyoplastik oder als muskuläre Blutpumpe, da dies zu Nekrosen am MLD führen kann.

Der pO_2 -Wert im Gewebe der unstimulierten Muskeln stieg während der Belastung an (nicht signifikant, Tab. 13), in den prästimulierten Muskeln fiel der Sauerstoffpartialdruck ab (nicht signifikant, Tab. 14). Sowohl das Ansteigen des Gewebssauerstoffpartialdrucks unter Belastung als auch die Reduktion unter Belastung ist in unserer kleinen Stichprobenmenge nicht signifikant. Um diese Ergebnisse zu verifizieren, müssen weitere Untersuchungen folgen.

4.4 Kapillaranzahl pro Muskelfaser

4.4.1 Wahl des Stimulationsmusters für die zweiwöchige Prästimulation

Bei der Suche nach einem geeigneten elektrischen Stimulationsmuster für die Kapillarvermehrung wurden verschiedene aus der Literatur bekannte experimentelle Studien mit elektrisch stimulierter Muskulatur miteinander verglichen. In solchen Stimulationsversuchen wurde der Musculus tibialis anterior (TA) oder der Musculus latissimus dorsi (MLD) von Ratten oder Kaninchen elektrisch stimuliert. Die untersuchten Studien aus der Literatur unterschieden sich nicht nur bei den gewählten Spezies, sondern auch in der Stimulationsfrequenz, der Stimulationsdauer pro Tag und der Stimulationsart (kontinuierlich, intermittierend; siehe Tab. 1).

4.4.1.1 Frequenz

Da es in Vorversuchen bei einer kontinuierlichen Prästimulation von 2 Hz zu keiner Erhöhung der Kapillaranzahl pro Muskelfaser gekommen war, wurden in unseren Analysen Arbeiten mit Stimulationfrequenzen unterhalb 10 Hz nicht einbezogen. Hudlicka et al. (77) zeigen, dass es mit einer hochfrequenten Stimulation (40 Hz) möglich ist die Kapillaranzahl pro Muskelfaser auf ähnliche Werte zu erhöhen wie mit 10 Hz. Allerdings setzt das Kapillarwachstum bei der 40 Hz Stimulation erst 7 Tage später ein. In allen Studien (A-E) werden elektrische Stimulationsmuster verwandt, bei denen der Skelettmuskel isometrisch zu einer Dauerkontraktion gebracht wird.

4.4.1.2 Kontinuierliche versus intermittierende Prästimulation

Es fällt auf, dass die intermittierenden Stimulationsmuster bei Kaninchen und Ratten (98,127), eine wesentlich höhere Kapillaranzahl pro Muskelfaser erzeugen als bei kontinuierlicher Stimulation. Überdies scheint jenes intermittierende Stimulationsmuster am besten geeignet zu sein, das den Muskel abwechselnd eine Stunde stimuliert und eine Stunde ruhen lässt (Tab. 1, Studie A).

4.4.1.3 Ausdauernde versus ermüdbare Skelettmuskulatur

Eine Prästimulation des schnellen, ermüdbaren M. tibialis anterior (TA) geht mit einer stärkeren Erhöhung der C/F (Kapillaranzahl pro Muskelfaser) einher, als es bei der Prästimulation des langsamen, ausdauernden MLD möglich erscheint (Tab. 1, Studie A+E). Allerdings liegt die C/F beim anaerob verstoffwechselnden

M. tibialis anterior vor der Stimulation niedriger als beim MLD. Somit scheint er auch ein größeres Potential zu besitzen, bei Belastung seine Kapillaranzahl pro Muskelfaser zu steigern (Tab. 1, Studie B+E).

4.4.1.4 Stimulationsdauer

Skrojanc et al. haben in ihrer Studie (A) nicht nur die Kapillaranzahl pro Muskelfaser bestimmt, sondern auch die interkapilläre Distanz und die mittlere kapilläre Querschnittsfläche. Da diese Messwerte nach 14 Tagen ihr Minimum im Bereich der interkapillären Distanz und ihr Maximum im Bereich der kapillären Querschnittsfläche erreichen, scheint eine 14-tägige Prästimulationsdauer bei Kaninchen auszureichen.

4.4.1.5 Fazit

Eine Prästimulation mit 10 Hz scheint zeitsparender zu sein als eine mit 40 Hz (77). Insbesondere bei einem klinischen Einsatz ist eine kurze Dauer vorteilhaft. Das intermittierende Stimulationsmuster erzeugt eine höhere Kapillaranzahl. Die vermehrte Angiogenese in Skelettmuskeln, die isometrisch elektrisch stimuliert wurden, ist gut untersucht und bewiesen (siehe 1.1.4). Deshalb wurde eine Burst-Stimulation nicht in Betracht gezogen.

Eine 14-tägige Prästimulation nach dem Stimulationsmuster (intermittierend; 10 Hz, 2-5V, 12h/day, 1h on-1h off) aus Studie A eignet sich vermutlich am besten, um die Kapillaranzahl in einem Skelettmuskel zu erhöhen. Zu diesem Schluss kommen auch Skrojanc et al.. Ein positiver Nebeneffekt des intermittierenden Stimulationsmusters ist, dass es auch die Muskelfasern zu schonen scheint, was besonders im Hinblick auf die klinische Anwendung dieser Verfahren Sinn macht (88,89). Aufgrund der beschriebenen Kriterien wurde das Stimulationsmuster A aus der Tabelle 1 übernommen.

Tabelle 1: Kapillaranzahl pro Muskelfaser im prästimulierten Skelettmuskel von Kaninchen und Ratten. Erhöhung der Kapillaranzahl pro Muskelfaser in Prozent (%) bezogen auf eine Muskelprobe entnommen vor Stimulationsbeginn (0) oder auf einen unstimulierten Kontrollmuskel (K).

Studie	A		B		C		D		E		F	
Spezies	Kaninchen		Ratte		Ratte		Kaninchen		Ratten		Ziegen	
trainierter Muskel	TA		TA		TA		TA		MLD		MLD	
Stimulationsdauer/Tag	12h/d		8h/d		8h/d		8h/d		8h/d		12h/d	
Prästimulation												
1.kontinuierlich					kontin.		kontin.		kontin.			
2.intermittierend	1h an 1h aus		2h an 4h aus								1h an 1h aus	
Frequenz	10 Hz		10 Hz		10 Hz		40 Hz		10 Hz		10Hz	
Stimulationsdauer in Tagen	0	14	0	28	0	7	0	14	K	14	K	14
Kapillaren pro Faser	1,6	4,2	0,19	0,4	0,67	0,8	1,4	1,8	0,56	1,02	1,5	2,1
Erhöhung Kapillaranzahl pro Faser in %	162		110		19		28		82		38	

- A** Skrojanc et al. (127) Sequential increase in capillarisation and mitochondrial enzymes in low-frequency-stimulated rabbit muscle. *Am J Physiol* 274: 810-818, 1998
- B** Mathieu-Costello et al. (98) Capillary-to-fibre surface ratio in rat fast-twitch hindlimb muscles after chronic electrical stimulation. *J Appl Physiol* 80 (3) : 904-909, 1996
- C** Dawson et al. (37) The effect of long-term activity on the microvasculature of rat glycolytic muscle. *Int J Microcirc* 8 : 53-69, 1989
- D** Hudlicka et al. (77) The effect of long-term high-frequency stimulation on capillary density and fibre types in rabbit fast muscles. *J Physiol* 353: 435-445, 1984
- E** Overgoor et al. (102) Can angiogenesis induced by chronic electrical stimulation enhance latissimus dorsi muscle flap survival for application in cardiomyoplasty. *Plast Reconstr Surg* 111: 178-187, 2003
- F** Daten aus den eigenen Untersuchungen

4.4.2 Kapillarvermehrung

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen im Mittel eine Erhöhung der Kapillaranzahl pro Muskelfaser (C/F) von $1,5 \pm 0,2$ auf $2,1 \pm 0,3$, entsprechend einer Steigerung von 38% ($p \leq 0,01$; Tab. 20). Dieses Ergebnis liegt unter unseren Erwartungen, da nach der angegebenen Literatur eine Steigerung in einem Skelettmuskel von 82% bei Ratten (Tab. 1, Studie E; MLD) und bis zu 160% bei Kaninchen (Tab. 1, Studie A; TA) möglich schien. In der Stimulationsstudie, an der wir uns orientierten, verwendeten Skrojanc et al. erwachsene männliche Kaninchen, in unserer Arbeit wurden männliche erwachsene Burenziegen verwendet. Da das Geschlecht und der Entwicklungsstand (erwachsen) übereinstimmten, kann der starke Unterschied im C/F-Verhältnis zwischen beiden Spezies damit nicht erklärt werden. Sonst hätte man zum Beispiel annehmen können, dass elektrisch trainierte Skelettmuskulatur von noch im Wachstum befindlichen Kaninchen eine besonders starke Erhöhung der Kapillaranzahl pro Muskelfaser erreichen würden. Es scheint auch Unterschiede zwischen den einzelnen Skelettmuskeln zu geben, denn im TA kann durch die Prästimulation eine höhere Anzahl an Kapillaren pro Muskelfaser erzeugt werden als im MLD (Tab. 1, Studie B+E). Die C/F in unserer Arbeit erreicht bei weitem nicht das Niveau von Kleintierstudien. Es stellt sich also auch hier die Frage, inwieweit man Ergebnisse auf den menschlichen Organismus übertragen darf, die im Rahmen von Kleintierstudien gewonnen wurden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es sinnvoll erscheint, vor einer klinischen Erprobung einer Methode diese zuerst an Großtieren zu testen.

Trotzdem ist eine Prästimulation als praktisch relevant zu betrachten, da selbst eine im Mittel um 38% erhöhte Kapillaranzahl mit einer Durchblutungssteigerung um 52% des prästimulierten Skelettmuskels im Rahmen der indirekten Myokardrevaskularisation eine weitere Optimierung der Durchblutungsverbesserung des ischämischen Myokards erbringen könnte. Schließlich waren die mit einer IMR behandelten Patienten (16) zwar 3-4 Wochen postoperativ beschwerdefrei, konnten auf Nitropräparate verzichten und ihre Belastungs-EKGs zeigten eine im Durchschnitt um 50 Watt höhere Belastbarkeit, doch im Bereich der Belastungsspitzen kam es bei den meisten Patienten zu Dyspnoe und Unwohlsein. So könnten die Patienten möglicherweise von der elektrisch induzierten Erhöhung der Kapillaranzahl profitieren. Für die muskuläre Therapie der terminalen Herzinsuffizienz mittels Kardiomyoplastik oder muskulärer Blutpumpen könnte die

Erhöhung dieser Parameter bedeuten, dass sich der oben erwähnte Kraft- und Leistungsverlust (Abb. 2+3) und vor allem die Ausbildung von Muskelnekrosen prästimulierter Muskeln minimieren ließen.

Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde bewusst nur auf die Kapillaranzahl pro Muskelfaser eingegangen, da die Kapillardichte pro mm^2 keine genaue Aussage über den tatsächlichen Zuwachs bzw. die tatsächliche Rückbildung an Kapillaren macht. Die Kapillardichte ist nämlich stark abhängig vom Durchmesser der Muskelfasern. Hypertrophieren diese, scheint die Kapillardichte abzunehmen. Bei Atrophien verhält es sich genau umgekehrt. Dies stellten Suzuki et al. (130) fest, sie behandelten Ratten mit dem β_2 -adrenergen Agonisten Clenbuterol, was zu einer Hypertrophie der Skelettmuskelfasern und der Herzmuskelzellen führte. Die Kapillardichte (Anzahl/ mm^2) nahm ab, die Kapillaranzahl pro Faser oder Zelle blieb jedoch gleich.

Lässt sich die Kapillaranzahl pro Faser noch weiter optimieren?

Ist diese Kapillarvermehrung auch medikamentös zu beeinflussen?

Es wäre denkbar, dass man Tieren während bzw. in den ersten Tagen der Elektrostimulation den α -Blocker bzw. Vasodilatator Prazosin verabreicht. Durch Vasodilatoren steigt der Blutfluss in den Kapillaren an, was eine luminale Erhöhung der Schubspannung bewirkt und hierdurch zu einem luminalen „Splitting“ der Kapillaren führt, d.h. die Kapillaranzahl nimmt zu (siehe 1.1.4). Hudlicka et al. (78) zeigten, dass schon nach drei Stunden kontinuierlicher Applikation von Prazosin der Ruheblutfluss im Musculus tibialis anterior um 180% zunimmt. Die Behandlung ist über fünf Wochen fortgeführt worden und erzielte einen 2-fachen Anstieg der Kapillaranzahl im Vergleich zu einer Kontrollgruppe. Im Jahr 2000 stellten Milkiewicz et al. (99) im Musculus extensor digitorum longus von Ratten fest, dass es unter Behandlung mit Prazosin schon in den ersten vier Tagen zu einer VEGF-Sezernierung im Bereich der Kapillaren kommt. Durch die elektrische Prästimulation (10 Hz; kontinuierlich 8h/d) kommt es hingegen erst vom vierten Tag an zu einer Sezernierung von VEGF, die im weiteren Verlauf wesentlich stärker ausfällt als bei der Prazosin-Medikation. Es stellt sich also die Frage, ob es sinnvoll ist, zu Beginn einer Prästimulation einen Vasodilatator (Prazosin) zu verabreichen, um eine möglichst frühe Ausschüttung des hochpotenten Wachstumsfaktors für Endothelien VEGF zu induzieren. Gerade bei der indirekten Myokardrevaskularisation scheint der Vorteil offensichtlich: Im

prästimulierten Muskel entstehen noch mehr Kapillaren und nach der Transplantation ist der Blutfluss in Richtung des ischämischen Herzmuskelgewebes noch besser gewährleistet. Eine weitere pharmazeutische Option zur Erhöhung des Blutflusses ist die lokale Applikation des „basic fibroblast growth factor“ (bFGF). Hierdurch lässt sich der Blutfluss ins Myokard und im MLD steigern (94). Außerdem wird der Muskel vor Schäden im Rahmen einer elektrischen Stimulation geschützt (94). Allerdings sollte man bei solchen Wachstumsfaktoren nicht außer Acht lassen, dass sie auch an der Bildung von Blutgefäßen maligner Neoplasien beteiligt sind (53,60), deshalb sollten die Nebenwirkungen vor einem therapeutischen Einsatz besser erforscht sein.

Andere Verfahren zur Erhöhung der Kapillaranzahl pro Muskelfaser und zur Steigerung des Blutflusses müssen noch besser untersucht werden. Einerseits ist es Song et al. (128) gelungen, die Arteriolenanzahl pro Muskelfaser, ihren Durchmesser und den Blutfluss im Muskel zu steigern. Dies war möglich durch intravenöse Injektion von Optison, das anschließend durch eine Ultraschallbehandlung im Bereich des Muskels Mikroblasen erzeugte, die Mikrotraumata im Gefäßnetz verursachten. Dadurch kommt es dann zu einer Neovaskularisation. Andererseits setzen Untersucher ihre Hoffnungen in die Injektion von Stammzellen in ischämische Muskeln, die dann eine Neovaskularisation hervorrufen sollen. Erfolge erzielten hier z.B. Tateishi-Yuyama et al. (134), sie injizierten Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit mononukleäre Knochenmarkstammzellen in einen Muskel der ischämischen Beine und stellten auch noch 24 Wochen danach eine Besserung der Beschwerden fest. Chekanov et al. (30) haben herausgefunden, dass es durch das Mobilisieren des Muskels besonders zu Schäden im Bereich der Kapillaren kommt. Schon drei Stunden danach sammeln sich dort eine große Anzahl von Leukozyten, die durch sezernierte Proteasen Schäden verursachen. Die Schäden an Endothelien, die nach der Mobilisation des MLD entstehen, konnten durch die Applikation eines Gemisches aus einem autologen Fibrinkleber und dem Proteaseinhibitor Aprotinin ins Muskelgewebe vermindert werden und so Nekrosenbildung verringern. Ein weiterer Schutz vor Nekrosenbildung ist möglicherweise die zweizeitige Mobilisation des Muskels. Barron et al. (11) haben festgestellt, dass ein prästimulierter MLD, dessen distale Blutversorgung vor der Prästimulation unterbrochen wird, nach dieser Stimulation eine signifikant bessere Durchblutung aufweist als ohne Ligation der distalen Blutversorgung.

4.5 Ausblick

Bei den vorliegenden Prästimulationen ist es durch ein definiertes, elektrisches Stimulationsmuster (intermittierend; 10 Hz, 2-5V, 12h/day, 1h on-1h off) gelungen, den Blutfluss in der A. thoracodorsalis des M. latissimus dorsi zusätzlich um 52% zu steigern. Dem entsprach eine Zunahme der Kapillaranzahl pro Muskelfaser um 38%.

Ein nach unserem Schema vortrainierter M. latissimus dorsi könnte die Grundlage zur indirekten muskulären Myokardrevaskularisation mit einem dynamischem

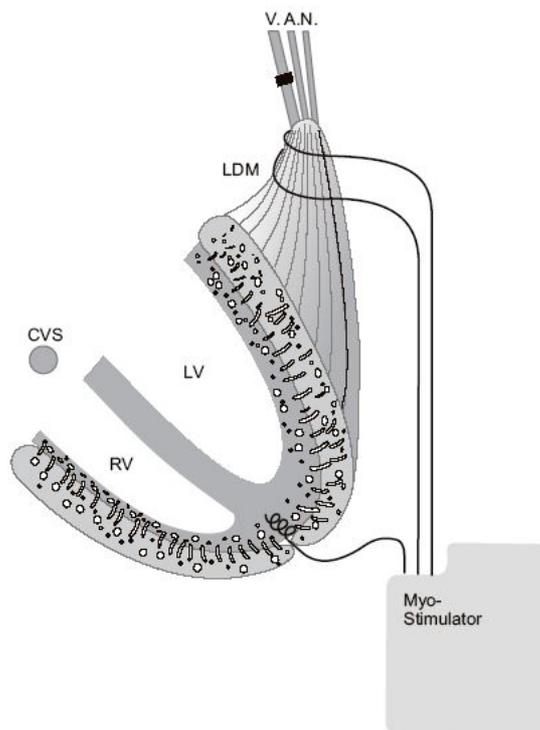


Abbildung 18: Indirekte Myokardrevaskularisation mit einem gestielten Musculus latissimus dorsi als dynamisches Girdling. Musculus latissimus dorsi (LDM), Arteria (A), Vena (V) und Nervus (N) thoracodorsalis, rechter (RV) und linker Ventrikel (LV), Sinus venosus (CVS). Verschluss der Vena thoracodorsalis durch Katheterembolisation (schwarzer Balken über Vene). Myostimulator zum EKG-getriggerten Einsatz bei Bedarf (on demand).

„Girdling“ bilden, die am UKSH Campus Lübeck zukünftig klinisch eingesetzt werden soll. Dabei bleibt der proximale Anteil mit A., V. und N. thoracodorsalis erhalten, der distale wird abgelöst und der Muskel wird um das Herz geschlungen. Der MLD wird „on demand“ elektrisch zur Kontraktion gebracht (Abb. 18). So könnte das ischämische Myokard von der zusätzlichen Vaskularisation über den MLD, dem bis zu 5-fach erhöhten extramyokardialen Kollateralblutfluss (96) und vom sogenannten „Girdling“-Effekt (Korsett-Effekt) des Transplantates profitieren. Durch die Muskelschlinge wird der ischämischen Dilatation des Myokards und einer Herzinsuffizienz entgegengewirkt (101). Patienten, die keine Chance auf eine Herztransplantation haben,

sollten also rechtzeitig in dieser Weise versorgt werden. Es sind auch andere „Girdling“-Verfahren z.B. der Einsatz eines sogenannten Acorn-Netzes (ACORN CARDIOVASCULAR, INC.; Minnesota; USA) in klinischer Erprobung. Hierbei wird ein Polyesternetz vollständig um die Ventrikel geschlungen. Es soll so die Dilatation und das Fortschreiten der Herzinsuffizienz verhindern (2,3,29). Nach

erster klinischer Erprobung an über 500 Patienten bekam das Acorn-Netz wegen eines fehlenden therapeutischen Effektes keine FDA-Zulassung.

Da der Blutfluss im prästimulierten MLD nur unter Belastungsbedingungen erhöht ist (siehe 3.2), sollte dieser wie oben erwähnt als dynamisches „Girdling“ nach seiner Herzschrägung weiterhin zur Kontraktion gebracht werden, um sein Durchblutungspotential zu nutzen. Mannion et al. (95) zeigten, dass es bei einem nicht elektrisch stimulierten MLD zwar zur extramyokardialen Kollateralenausbildung ins ischämische Myokard kommt, allerdings scheinen diese Umgehungskreisläufe allein nicht auszureichen, ein akutes ischämisches Ereignis zu verhindern, da der Blutfluss aus dem MLD nur ungefähr 8% des Kollateralblutflusses zum chronisch ischämischen Myokard ausmacht (23). Somit bestätigt sich die Annahme, dass Maßnahmen notwendig sind, den Blutfluss zu erhöhen. Die akute elektrische Burst-Stimulation (1,25 Hz; 75 bpm; 5 min Dauer) einer Kardiomyopexie erhöht den Blutfluss in Richtung des ischämischen Myokards um das 5-fache und erreicht 38% des Kollateralblutflusses (96). Im Gegensatz hierzu erbringt eine kontinuierliche Dauerstimulation nur einen um 24% erhöhten extramyokardialen Kollateralblutfluss über den MLD (8).

Ein EKG-getriggter Myostimulator könnte bei Überschreiten einer bestimmten Herzfrequenz den MLD zur Kontraktion bringen, sodass der Skelettmuskel „on demand“ eingesetzt wird. Eine starke Belastung des Muskels mit 55 Kontraktionen pro Minute wie in unseren Untersuchungen, ist unter klinischen Bedingungen nicht praktikabel. Ein solch bruskes Stimulationsmuster könnte die neu ausgebildeten Gefäße zwischen MLD und Myokard zerstören.

Ein positiver Nebeneffekt der elektrischen Stimulation eines transplantierten Muskels ist, dass sie den „Girdling“-Effekt noch optimiert, selbst wenn die Stimulation nur „on demand“ stattfindet (27,110).

Die Verwendung des Musculus latissimus dorsi als herzmuskelunterstützendes System scheint eine klinisch relevante Alternative zur Behandlung der KHK oder der Herzinsuffizienz zu sein, denn er steht bei den meisten Patienten zur Verfügung und ist als Muskel entbehrlich. Somit sind Engpässe in der Bereitstellung nicht zu erwarten. Außerdem kann es keine Abstoßungsreaktionen geben und eine Immunsuppression wie bei einer Herztransplantation ist somit überflüssig. Das Infektionsrisiko der Patienten ist also nicht erhöht.

Fazit für:

1. Indirekte muskuläre Myokardrevaskularisation mit dynamischem

Girdling:

Die indirekte Myokardrevaskularisation mit dem M. latissimus dorsi, wie sie Beyer einsetzte, bewirkte für die Patienten eine deutliche Verbesserung der Lebensqualität, allerdings bestand weiterhin bei Belastungsspitzen Dyspnoe und Unwohlsein (16). Durch die hier erhobenen Befunde lässt sich vermutlich diese IMR noch deutlich verbessern:

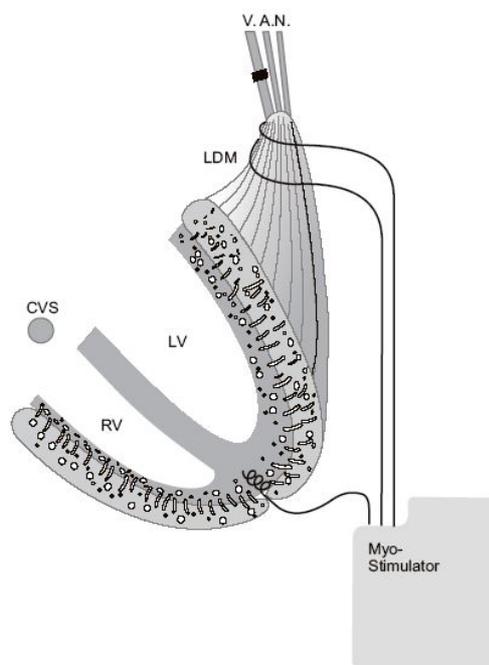


Abbildung 19: Indirekte Myokardrevaskularisation mit einem gestielten Musculus latissimus dorsi als dynamisches Girdling. Musculus latissimus dorsi (LDM), Arteria (A), Vena (V) und Nervus (N) thoracodorsalis, rechter (RV) und linker Ventrikel (LV), Sinus venosus (CVS). Verschluss der Vena thoracodorsalis durch Katheterembolisation (schwarzer Balken über Vene). Myostimulator zum EKG-getriggerten Einsatz bei Bedarf (on demand).

- Eine Prästimulation nach unserem Muster (intermittierend; 10 Hz, 2-5V, 12h/day, 1h on-1h off) erzielt eine um 38% höhere Kapillaranzahl pro Muskelfaser als im unstimulierten Muskel. Unter Belastung liegt der Blutfluss im MLD um 52% höher als im unstimulierten, somit geht vermutlich auch ein höherer Blutfluss auf das Myokard über. Außerdem wird es im distalen Bereich des Muskel durch die bessere Kapillarisation und die Öffnung von Kollateralen zu keiner distalen

Nekrosenbildung kommen, sodass der MLD als gestieltes Transplantat eingesetzt werden kann und nicht wie bei Beyer als freies. Dies macht einen mikrochirurgischen Anschluss des Transplantats überflüssig,

verkürzt die Operation und senkt das Risiko eines Transplantatversagens.

- Der prästimulierte und gestielte MLD sollte nach erfolgter perikardialer Anlage „on demand“ (z.B. EKG-getriggert) elektrisch zur Kontraktion gebracht werden, um auch die Vervielfachung der Muskeldurchblutung vom ruhenden zum aktiven Muskel voll auszuschöpfen und eine Überbelastung zu verhindern. Die Blutversorgung für das Myokard würde gesteigert und der „Girdling“- Effekt wirkte der myokardialen Wandspannung entgegen.

2. Muskuläre Blutpumpen:

- Durch eine Prästimulation verfügt der eingesetzte Muskel über eine erhöhte Kapillaranzahl pro Muskelfaser und er wird unter Belastung besser durchblutet, was zu einer Kraft- und Leistungsverbesserung führt.
- Weiterführende Untersuchungen sollten die Rolle der angedeuteten Sauerstoffpartialdruckerniedrigung im Gewebe eines prästimulierten belasteten Skelettmuskels klären, um zu erwartende Schäden zu verhindern.

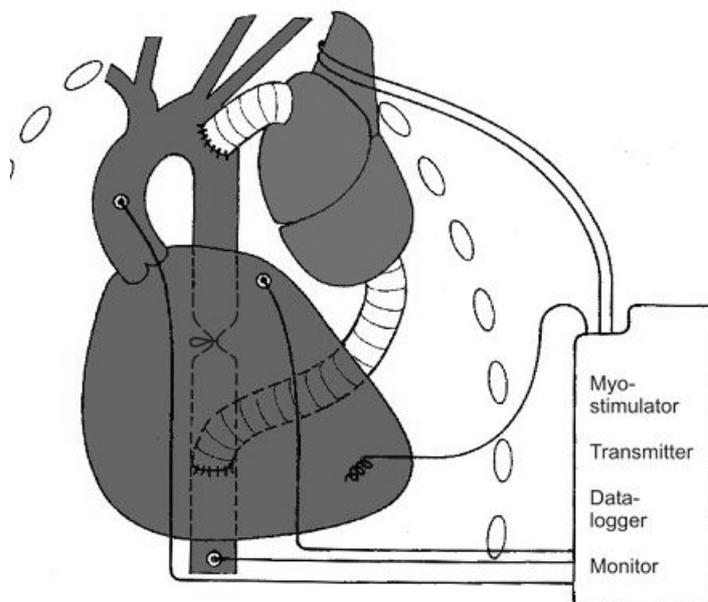


Abbildung 20: Biomechanisches Herz im Thorax des Menschen (N.W. Guldner) aus: P. Feindt et al.. Synopse der biologischen und mechanischen Kreislaufunterstützung. S.221, 2003

5 Zusammenfassung

In den westlichen Industrieländern sind Herz-Kreislauf-Erkrankungen die Todesursache Nummer Eins. Dazu zählen vor allem die koronare Herzerkrankung und die terminale Herzinsuffizienz. Da nicht alle koronaren Herzerkrankungen stent- und bypassfähig sind und für die terminale Herzinsuffizienz zu wenig Spenderherzen zur Verfügung stehen, werden für beide Erkrankungen Therapiealternativen gesucht. Dabei könnten muskuläre Herzunterstützungssysteme geeignet sein. Die indirekte muskuläre Myokardrevaskularisation durch den M. latissimus dorsi (MLD) wurde bereits klinisch eingesetzt, die meisten Patienten hatten einen Nutzen davon, besonders jene mit einem „Coronary Small Vessel Disease“. Muskuläre Blutpumpen sind eine viel versprechende Option in der Behandlung der fortgeschrittenen terminalen Herzinsuffizienz. Zur Optimierung und auch im Hinblick auf einen klinischen Einsatz muskulärer Herzunterstützungssysteme sollten Funktion und Morphologie eines über 2 Wochen prästimulierten MLD im Großtierexperiment untersucht werden.

Bei 6 Burenböcken wurde unilateral der M. latissimus dorsi für 14 Tage mit einem definierten Stimulationsmuster elektrisch prästimuliert (12h/d, 1h on-1h off, 10 Hz, 2-5V). Danach erfolgte die Messung der Ruhedurchblutung beider MLD in der A. thoracodorsalis. Im Rahmen eines Belastungstestes wurde während der letzten drei von zehn Stimulationsminuten der Blutfluss der A. thoracodorsalis und der Sauerstoffpartialdruck im Gewebe beider MLD unter definierten Belastungsbedingungen (55 bpm über 10 Minuten) evaluiert und verglichen. Aus Biopsien des mittleren Drittels beider MLD erfolgte die morphometrische Bestimmung der Kapillaranzahl pro Faser.

Im unstimulierten MLD (n=5) erhöhte sich der Blutfluss in der A. thoraco-dorsalis vom Ruhewert $5,1 \pm 2,8$ auf $19,9 \pm 0,9$ ml/min unter Belastungsbedingungen. Das entspricht einer Steigerung von $285 \pm 15,6\%$. Im Prästimulierten (n=5) stieg der Fluss von $5 \pm 2,4$ auf $30,2 \pm 2,7$ ml/min, entsprechend einer Steigerung um $480,4 \pm 42\%$. Der prästimulierte MLD hatte also einen im Mittel 52% höheren Blutfluss unter Belastung ($p \leq 0,01$). Im unstimulierten (n=5) MLD stieg der muskuläre Sauerstoffpartialdruck unter Belastung an (nicht signifikant, $p \geq 0,05$). Im prästimulierten (n=3) aber verringerte sich dieser (nicht signifikant, $p \geq 0,05$). Die histologische Auswertung (n=5) zeigte im prästimulierten Muskel eine um 38% ($p \leq 0,01$) höhere Kapillaranzahl pro Muskelfaser als im unstimulierten.

Diese Ergebnisse über Blutfluss, Sauerstoffpartialdruck und Kapillardichte im elektrisch prästimulierten Musculus latissimus dorsi könnten zur Funktionsverbesserung und zur Vermeidung von Gewebsschäden muskulärer Herzunterstützungssysteme beitragen.

6 Anhang

6.1 Tabellen

6.1.1 Blutfluss

Tabelle 2: Absolutwerte des Blutflusses (ml/min) der Arteria thoracodorsalis des unstimulierten Musculus latissimus dorsi während (1.-10. Minute; grau hinterlegt) und nach Belastung (11.-40. Minute). Werte in erster Zeile (Minute 0) entsprechen Ruhewerten. Die freien Felder entsprechen einer Fehlfunktion der Messtechnik.

Zeit	B1	B2	B3	B4	B5	B6	Mittelwert
[min]	[ml/min]						
0	1,2		7,8	5,4	3,3	7,6	5,1 ± 2,8
1			22,2	22,8	16,0	26,0	21,8 ± 4,2
2	3,3		26,2	24,7	19,8	27,9	20,4 ± 10,0
3	3,5		25,2	22,7	19,5	29,4	20,1 ± 9,9
4	3,5		26,4	23,0	18,2	30,4	20,3 ± 10,4
5	3,6		27,2	19,3	16,0	30,5	19,3 ± 10,6
6	3,6		30,0	18,5	14,9	31,8	19,8 ± 11,6
7	4,1		28,3	19,5	14,1	32,9	19,8 ± 11,4
8	4,3		29,5	15,1	13,8	33,3	19,2 ± 12,0
9	4,3		28,3	12,2	12,9	33,1	18,2 ± 12,1
10	4,4		27,5	21,6	12,5	33,7	19,9 ± 11,7
11	3,5		20,3	17,2	10,1	32,2	16,7 ± 10,9
12	2,8		16,5	13,0	9,4	31,9	14,7 ± 10,9
13	2,3		14,1	12,9	8,7	31,6	13,9 ± 10,9
14	2,1		13,5	14,0	8,1	32,0	13,9 ± 11,2
15	1,9		11,2	10,8	7,5	31,1	12,5 ± 11,0
16	1,8		9,8	8,1	7,1	31,3	11,6 ± 11,4
17			9,1	9,0	7,0	30,8	14,0 ± 11,3
18	1,6		8,9	6,7	6,5	29,0	10,5 ± 10,7
19			8,6	5,0	6,1	27,5	11,8 ± 10,6
20	1,5		7,9	5,0	5,9		5,1 ± 2,7
21	1,5		8,2	6,5			5,4 ± 3,5
22			7,9	5,3	5,4	23,0	10,4 ± 8,5
23			7,7				7,7 ±
24			7,6				7,6 ±
25	1,4		7,6	7,8	5,1	18,3	8,0 ± 6,3
40	1,4		6,5	7,7	4,5	15,5	7,1 ± 5,3

Tabelle 3: Absolutwerte des Blutflusses (ml/min) der Arteria thoracodorsalis des prästimulierten Musculus latissimus dorsi während (1.-10. Minute; grau hinterlegt) und nach Belastung (11.-40. Minute). Werte in erster Zeile (Minute 0) entsprechen Ruhewerten. Die freien Felder entsprechen einer Fehlfunktion der Messtechnik.

Zeit	B1	B2	B3	B4	B5	B6	Mittelwert	
[min]	[ml/min]	[ml/min]						
0	2,8		6,9	2,3	5,8	7,4	5,0	± 2,4
1	16,0		35,5	12,4	16,1	47,0	25,4	± 15,1
2	16,9		38,3	11,2	16,0	48,0	26,1	± 16,1
3	17,7		41,3	11,0	22,0	47,0	27,8	± 15,6
4	17,7		40,9		29,0	47,0	33,7	± 13,0
5	16,9		41,1	10,4	33,0	47,0	29,7	± 15,6
6	16,7		39,4	10,7	44,0	46,0	31,4	± 16,4
7	17,0		43,3	10,9	42,0	46,0	31,8	± 16,5
8	17,3		43,3	11,6	44,3	45,0	32,3	± 16,4
9	17,1		41,8	12,1	44,5	46,0	32,3	± 16,3
10	17,7		40,5	10,0	46,4	45,0	31,9	± 16,9
11	14,4		34,5	15,4	28,0	29,0	24,3	± 8,9
12	12,2		38,7	16,2	24,5	27,0	23,7	± 10,3
13	11,5		28,5	16,2	24,1	26,0	21,3	± 7,1
14	10,4		26,5	15,9	20,0	26,0	19,8	± 6,8
15	8,6		22,9	15,9	17,1	26,0	18,1	± 6,7
16	8,0		23,2	15,8	15,5	25,0	17,5	± 6,8
17	6,6		19,6	15,8	14,2	25,0	16,2	± 6,8
18	5,6		15,0	15,4	10,7	25,0	14,3	± 7,2
19	4,8		13,8	14,4	9,8	25,0	13,6	± 7,5
20	5,2		11,8	13,5	9,1	25,0	12,9	± 7,4
21	3,9		10,2	12,1		25,0	12,8	± 8,9
22	3,9		9,5	11,4	8,7	25,0	11,7	± 7,9
23	3,7			9,8			6,8	± 4,3
24	3,4		8,1	8,1			6,5	± 2,7
25	3,3		8,0	6,7	6,7	25,0	9,9	± 8,6
40	2,6		5,7	2,7	6,1	25,0	8,4	± 9,4

Tabelle 4: Mittelwerte des Blutflusses (Absolutwerte, ml/min) in der Arteria thoracodorsalis des un- (n=5) und prästimulierten (n=5) Musculus latissimus dorsi während Belastung von 10 Minuten. MW (Mittelwert).

Zeit	[min]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MW
Mittelwerte unstimuliert	[ml/min]	21,8	20,4	20,1	20,3	19,3	19,8	19,8	19,2	18,2	19,9	19,9 ± 0,9
Mittelwerte prästimuliert	[ml/min]	25,4	26,1	27,8	33,7	29,7	31,4	31,8	32,3	32,3	31,9	30,2 ± 2,7
Differenz in %												52
												p ≤ 0,01

Tabelle 5: Absolutwerte des Blutflusses (ml/min) unter Belastung (Mittelwerte der letzten 3 Min. unter Belastung) und des Ruheblutflusses der Arteria thoracodorsalis des unstimulierten Musculus latissimus dorsi. MW (Mittelwert).

Tier		B1	B3	B4	B5	B6	MW		
Ruhe-	[ml/min]	1,2	7,8	5,4	3,3	7,6	5,1	±	2,8
blutfluss									
unstimuliert									
Blutfluss unter	[ml/min]	4,3	28,4	16,3	13,1	33,4	19,1	±	11,8
Belastung									
unstimuliert									
Veränderung							277		
in %									
									p≤0,05

Tabelle 6: Absolutwerte des Blutflusses (ml/min) unter Belastung (Mittelwerte der letzten 3 Min. unter Belastung) und des Ruheblutflusses der Arteria thoracodorsalis des prästimulierten Musculus latissimus dorsi. MW (Mittelwert).

Tier		B1	B3	B4	B5	B6	MW		
Ruhe-	[ml/min]	2,8	6,9	2,3	5,8	7,4	5,0	±	2,4
blutfluss									
prästimuliert									
Blutfluss unter	[ml/min]	17,4	41,9	11,2	45,1	45,3	32,2	±	16,5
Belastung									
prästimuliert									
Veränderung							538		
in %									
									p≤0,05

Tabelle 7: Auf den Ausgangswert normierter Blutfluss [%] in der Arteria thoracodorsalis des unstimulierten Musculus latissimus dorsi während (grau hinterlegt) und nach Belastung. Die Veränderung des Blutflusses wird jeweils auf seinen Ruhewert bezogen (Minute 0). Die freien Felder entsprechen einer Fehlfunktion der Messtechnik.

Zeit	B1	B2	B3	B4	B5	B6	Mittelwert	
[min]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
0	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	± 0,0
1			184,6	322,2	384,8	242,1	283,4	± 88,1
2	175,0		235,9	357,4	500,0	267,1	307,1	± 126,4
3	191,7		223,1	320,4	490,9	286,8	302,6	± 116,9
4	191,7		238,5	325,9	451,5	300,0	301,5	± 98,9
5	200,0		248,7	257,4	384,8	301,3	278,5	± 69,5
6	200,0		284,6	242,6	351,5	318,4	279,4	± 60,0
7	241,7		262,8	261,1	327,3	332,9	285,2	± 41,9
8	258,3		278,2	179,6	318,2	338,2	274,5	± 61,7
9	258,3		262,8	125,9	290,9	335,5	254,7	± 78,3
10	266,7		252,6	300,0	278,8	343,4	288,3	± 35,4
11	191,7		160,3	218,5	206,1	323,7	220,0	± 61,9
12	133,3		111,5	140,7	184,8	319,7	178,0	± 83,6
13	91,7		80,8	138,9	163,6	315,8	158,2	± 94,4
14	75,0		73,1	159,3	145,5	321,1	154,8	± 101,0
15	58,3		43,6	100,0	127,3	309,2	127,7	± 106,8
16	50,0		25,6	50,0	115,2	311,8	110,5	± 117,3
17			16,7	66,7	112,1	305,3	125,2	± 126,2
18	33,3		14,1	24,1	97,0	281,6	90,0	± 111,9
19			10,3	-7,4	84,8	261,8	87,4	± 123,0
20	25,0		1,3	-7,4	78,8		24,4	± 38,7
21	25,0		5,1	20,4				± 10,4
22			1,3	-1,9	63,6	202,6		± 95,7
23			-1,3					±
24			-2,6					±
25	16,7		-2,6	44,4	54,5	140,8	50,8	± 55,1
40	16,7		-16,7	42,6	36,4	103,9	36,6	± 44,2

Tabelle 8: Auf den Ausgangswert normierter Blutfluss [%] in der Arteria thoracodorsalis des prästimulierten Musculus latissimus dorsi während (grau hinterlegt) und nach Belastung. Die Veränderung des Blutflusses wird jeweils auf seinen Ruhewert bezogen (Minute 0). Die freien Felder entsprechen einer Fehlfunktion der Messtechnik.

Zeit	B1	B2	B3	B4	B5	B6	Mittelwert
[min]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
0	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0 ± 0,0
1	471,4		414,5	439,1	177,6	535,1	407,6 ± 136,3
2	503,6		455,1	387,0	175,9	548,6	414,0 ± 146,0
3	532,1		498,6	378,3	279,3	535,1	444,7 ± 112,4
4	532,1		492,8		400,0	535,1	490,0 ± 63,0
5	503,6		495,7	352,2	469,0	535,1	471,1 ± 70,5
6	496,4		471,0	365,2	658,6	521,6	502,6 ± 105,6
7	507,1		527,5	373,9	624,1	521,6	510,9 ± 89,4
8	517,9		527,5	404,3	663,8	508,1	524,3 ± 92,4
9	510,7		505,8	426,1	667,2	521,6	526,3 ± 87,5
10	532,1		487,0	334,8	700,0	508,1	512,4 ± 130,2
11	414,3		400,0	569,6	382,8	291,9	411,7 ± 100,3
12	335,7		460,9	604,3	322,4	264,9	397,6 ± 135,9
13	310,7		313,0	604,3	315,5	251,4	359,0 ± 139,7
14	271,4		284,1	591,3	244,8	251,4	328,6 ± 147,7
15	207,1		231,9	591,3	194,8	251,4	295,3 ± 166,9
16	185,7		236,2	587,0	167,2	237,8	282,8 ± 172,8
17	135,7		184,1	587,0	144,8	237,8	257,9 ± 188,3
18	100,0		117,4	569,6	84,5	237,8	221,9 ± 203,6
19	71,4		100,0	526,1	69,0	237,8	200,9 ± 194,6
20	85,7		71,0	487,0	56,9	237,8	187,7 ± 182,5
21	39,3		47,8	426,1		237,8	187,8 ± 183,4
22	39,3		37,7	395,7	50,0	237,8	152,1 ± 160,4
23	32,1			326,1		-100,0	86,1 ± 218,1
24	21,4		17,4	252,2		-100,0	47,7 ± 147,5
25	17,9		15,9	191,3	15,5	237,8	95,7 ± 109,8
40	-7,1		-17,4	17,4	5,2	237,8	47,2 ± 107,4

Tabelle 9: Mittelwerte des auf den Ausgangswert normierten Blutflusses [%] in der Arteria thoracodorsalis des un- (n=5) und prästimulierten (n=5) Musculus latissimus dorsi während Belastung von 10 Minuten. MW (Mittelwert).

Zeit	[min]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MW
MW unstim.	[%]	283,4	307,1	302,6	301,5	278,5	279,4	285,2	274,5	254,7	288,3	285,5±15,6
MW prästim.	[%]	407,6	414,0	444,7	490,0	471,1	502,6	510,9	524,3	526,3	512,4	480,4±42,0

6.1.2 Sauerstoffpartialdruck

Tabelle 10: Absolutwerte des Sauerstoffpartialdrucks (mmHg) im Gewebe des unstimulierten Musculus latissimus dorsi während (Minute 1-10; grau hinterlegt) und nach Belastung (Minute 11-40). Werte in erster Zeile (Minute 0) entsprechen Ruhewerten. Die freien Felder entsprechen einer Fehlfunktion der Messtechnik.

Zeit	B1	B2	B3	B4	B5	B6	Mittelwert
[min]	[mmHg]						
0	9,1	8,6	19,0		26,4	13,8	15,4 ± 7,5
1		8,9	27,6		26,1	13,5	19,0 ± 9,2
2	13,4	8,8			26,1	16,0	16,1 ± 7,3
3	13,0	8,9	22,2		31,9	17,6	18,7 ± 8,9
4	12,7	9,0	19,8		36,4	17,9	19,2 ± 10,5
5	12,8	8,8	19,1		41,3	17,9	20,0 ± 12,6
6	12,6	8,5	18,5		41,9	17,6	19,8 ± 13,0
7	12,7	8,4	17,6		43,7	17,6	20,0 ± 13,8
8	12,7	8,9	17,8		45,4	17,6	20,5 ± 14,4
9	12,8	9,3	18,5		44,4	17,6	20,5 ± 13,9
10	13,1	10,0	20,4		43,3	17,9	20,9 ± 13,1
11	13,1	12,5	16,1		40,6	17,6	20,0 ± 11,7
12	12,6	12,5	18,2		41,2	17,6	20,4 ± 11,9
13	12,1	12,1	19,6		37,8	17,9	19,9 ± 10,6
14	11,8	11,9	20,1		38,8	18,2	20,2 ± 11,1
15	11,5	11,5	21,5		38,0	17,9	20,1 ± 10,9
16	11,3	11,4	23,1		36,8	18,2	20,2 ± 10,5
17		11,1	22,7		36,1	17,9	22,0 ± 10,6
18	10,9	11,1	23,1		34,0	18,2	19,5 ± 9,6
19		10,9	23,5		34,7	18,5	21,9 ± 10,0
20	10,7	11,0	23,2		33,3	17,6	19,2 ± 9,4
21	10,3	10,9	23,4				14,9 ± 7,4
22		10,9	23,5		31,9	17,9	21,1 ± 8,9
23		10,9	23,9				17,4 ± 9,2
24		11,0	23,7				17,4 ± 9,0
25	10,1	11,0	23,9		30,6	18,5	18,8 ± 8,7
40	9,1	11,1	22,6		29,9	20,6	18,7 ± 8,6

Tabelle 11: Absolutwerte des Sauerstoffpartialdrucks (mmHg) im Gewebe des prästimulierten Musculus latissimus dorsi während (Minute 1-10; grau hinterlegt) und nach Belastung (Minute 11-40). Werte in erster Zeile (Minute 0) entsprechen Ruhewerten. Die freien Felder entsprechen einer Fehlfunktion der Messtechnik.

Zeit	B1	B2	B3	B4	B5	B6	Mittelwert
[min]	[mmHg]						
0			14,5		23,6	31,0	23,0 ± 8,3
1			8,1		21,2	21,0	16,8 ± 7,5
2			12,7		20,2	17,3	16,7 ± 3,8
3			16,0		23,0	16,3	18,4 ± 4,0
4			10,9		20,9	16,9	16,2 ± 5,0
5			6,6		20,5	16,3	14,5 ± 7,1
6			5,9		26,4	16,9	16,4 ± 10,3
7			4,7		32,0	17,9	18,2 ± 13,7
8			6,3			21,4	13,9 ± 10,7
9			4,8		30,2	23,6	19,5 ± 13,2
10			3,8		27,8	24,5	18,7 ± 13,0
11			5,2		25,4	40,0	23,5 ± 17,5
12			10,3		26,4	44,2	27,0 ± 17,0
13			14,6		29,5	46,4	30,2 ± 15,9
14			17,1		20,2	46,7	28,0 ± 16,3
15			18,9		22,3	46,7	29,3 ± 15,2
16			17,9		23,3	46,1	29,1 ± 15,0
17			19,6		20,5	45,7	28,6 ± 14,8
18			20,9		19,5	45,1	28,5 ± 14,4
19			19,4		18,5	43,5	27,1 ± 14,2
20			18,7		17,8	42,6	26,4 ± 14,1
21			18,6			41,6	30,1 ± 16,3
22			17,9		16,4	40,7	25,0 ± 13,6
23							±
24			16,5				16,5 ±
25			16,5		14,3	37,8	22,9 ± 13,0
40			13,8		16,4	31,2	20,5 ± 9,4

Tabelle 12: Mittelwerte des Sauerstoffpartialdrucks (Absolutwerte, mmHg) im Gewebe des un- (n=5) und prästimulierten (n=3) Musculus latissimus dorsi während Belastung von 10 Minuten. MW (Mittelwert).

Zeit	[min]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MW
Mittelwerte unstimuliert	[mmHg]	19	16,1	18,7	19,2	20	19,8	20	20,5	20,5	20,9	19,5±1,4
Mittelwerte prästimuliert	[mmHg]	16,8	16,7	18,4	16,2	14,5	16,4	18,2	13,9	19,5	18,7	16,9±1,8

Tabelle 13: Absolutwerte des Sauerstoffpartialdrucks (mmHg) unter Belastung (Mittelwerte der letzten 3 Min. unter Belastung) und des Ruhesauerstoffpartialdrucks der Arteria thoracodorsalis des unstimulierten Musculus latissimus dorsi. MW (Mittelwert), (n.s.=nicht signifikant).

Tier		B1	B2	B3	B5	B6	MW	
Ruhe- pO2 unstimuliert	[mmHg]	9,1	8,6	19,0	26,4	13,8	15,4	± 7,5
pO2 unter Belastung unstimuliert	[mmHg]	12,9	9,4	18,9	44,4	17,7	20,7	± 13,8
Veränderung in %							34	
							n.s.	

Tabelle 14: Absolutwerte des Sauerstoffpartialdrucks (mmHg) unter Belastung (Mittelwerte der letzten 3 Min. unter Belastung) und des Ruhesauerstoffpartialdrucks der Arteria thoracodorsalis des prästimulierten Musculus latissimus dorsi. MW (Mittelwert), (n.s.=nicht signifikant).

Tier		B3	B5	B6	MW	
Ruhe- pO2 prästimuliert	[mmHg]	14,5	23,6	31,0	23	± 8,3
pO2 unter Belastung prästimuliert	[mmHg]	5,0	29,0	23,2	19,1	± 12,5
Veränderung in %					-11	
					n.s.	

Tabelle 15: Auf den Ausgangswert normierter Sauerstoffpartialdruck [%] im Gewebe des unstimulierten Musculus latissimus dorsi während (grau hinterlegt) und nach Belastung. Die Veränderung des Blutflusses wird jeweils auf seinen Ruhewert bezogen (Minute 0). Die freien Felder entsprechen einer Fehlfunktion der Messtechnik.

Zeit	B1	B2	B3	B4	B5	B6	Mittelwert
[min]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
0	0,0	0,0	0,0		0,0	0,0	0,0 ± 0,0
1		3,5	45,3		-1,1	-2,2	11,4 ± 22,7
2	47,3	2,3			-1,1	15,9	16,1 ± 22,0
3	42,9	3,5	16,8		20,8	27,5	22,3 ± 14,5
4	39,6	4,7	4,2		37,9	29,7	23,2 ± 17,5
5	40,7	2,3	0,5		56,4	29,7	25,9 ± 24,3
6	38,5	-1,2	-2,6		58,7	27,5	24,2 ± 26,3
7	39,6	-2,3	-7,4		65,5	27,5	24,6 ± 30,2
8	39,6	3,5	-6,3		72,0	27,5	27,2 ± 31,0
9	40,7	8,1	-2,6		68,2	27,5	28,4 ± 27,9
10	44,0	16,3	7,4		64,0	29,7	32,3 ± 22,5
11	44,0	45,3	-15,3		53,8	27,5	31,1 ± 27,6
12	38,5	45,3	-4,2		56,1	27,5	32,6 ± 23,1
13	33,0	40,7	3,2		43,2	29,7	29,9 ± 15,9
14	29,7	38,4	5,8		47,0	31,9	30,5 ± 15,4
15	26,4	33,7	13,2		43,9	29,7	29,4 ± 11,2
16	24,2	32,6	21,6		39,4	31,9	29,9 ± 7,1
17		29,1	19,5		36,7	29,7	28,7 ± 7,1
18	19,8	29,1	21,6		28,8	31,9	26,2 ± 5,2
19		26,7	23,7		31,4	34,1	29,0 ± 4,7
20	17,6	27,9	22,1		26,1	27,5	24,3 ± 4,4
21	13,2	26,7	23,2				21,0 ± 7,0
22		26,7	23,7		20,8	29,7	25,2 ± 3,8
23		26,7	25,8				26,3 ± 0,7
24		27,9	24,7				26,3 ± 2,2
25	11,0	27,9	25,8		15,9	34,1	22,9 ± 9,3
40	0,0	29,1	18,9		13,3	49,3	22,1 ± 18,5

Tabelle 16: Auf den Ausgangswert normierter Sauerstoffpartialdruck [%] im Gewebe des prästimulierten Musculus latissimus dorsi während (grau hinterlegt) und nach Belastung. Die Veränderung des Blutflusses wird jeweils auf seinen Ruhewert bezogen (Minute 0). Die freien Felder entsprechen einer Fehlfunktion der Messtechnik.

Zeit	B1	B2	B3	B4	B5	B6	Mittelwert
[min]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
0			0,0		0,0	0,0	0,0 ± 0,0
1			-44,1		-10,2	-32,3	-28,9 ± 17,2
2			-12,4		-14,4	-44,2	-23,7 ± 17,8
3			10,3		-2,5	-47,4	-13,2 ± 30,3
4			-24,8		-11,4	-45,5	-27,3 ± 17,2
5			-54,5		-13,1	-47,4	-38,3 ± 22,1
6			-59,3		11,9	-45,5	-31,0 ± 37,7
7			-67,6		35,6	-42,3	-24,8 ± 53,8
8			-56,6			-31,0	-43,8 ± 18,1
9			-66,9		28,0	-23,9	-20,9 ± 47,5
10			-73,8		17,8	-21,0	-25,7 ± 46,0
11			-64,1		7,6	29,0	-9,2 ± 48,8
12			-29,0		11,9	42,6	8,5 ± 35,9
13			0,7		25,0	49,7	25,1 ± 24,5
14			17,9		-14,4	50,6	18,1 ± 32,5
15			30,3		-5,5	50,6	25,2 ± 28,4
16			23,4		-1,3	48,7	23,6 ± 25,0
17			35,2		-13,1	47,4	23,2 ± 32,0
18			44,1		-17,4	45,5	24,1 ± 35,9
19			33,8		-21,6	40,3	17,5 ± 34,0
20			29,0		-24,6	37,4	13,9 ± 33,6
21			28,3			34,2	31,2 ± 4,2
22			23,4		-30,5	31,3	8,1 ± 33,6
23							±
24			13,8				13,8 ±
25			13,8		-39,4	21,9	-1,2 ± 33,3
40			-4,8		-30,5	0,6	-11,6 ± 16,6

Tabelle 17: Mittelwerte des auf den Ausgangswert normierten Sauerstoffpartialdrucks [%] im Gewebe des un- (n=5) und prästimulierten (n=3) Musculus latissimus dorsi während Belastung von 10 Minuten. MW (Mittelwert).

Zeit	[min]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MW
Mittelwerte unstimuliert	[%]	11,4	16	22,3	23,2	25,9	24,2	24,6	27,2	28,4	32,3	23,6±6,0
Mittelwerte prästimuliert	[%]	-28,9	-23,7	-13,2	-27,3	-38,3	-31	-24,8	-43,8	-20,9	-25,7	- 27,8±8,6

6.1.3 Kapillaranzahl pro Muskelfaser

Tabelle 18: Kapillaranzahl pro Muskelfaser (C/F=capillary-to-fibre-ratio) im unstimulierten Musculus latissimus dorsi bei Burenziegen (B₁,B₃₋₆). Angabe von Mittelwert und Standardabweichung.

Messfeld	B1	B2	B3	B4	B5	B6	gesamt
	[C/F]	[C/F]	[C/F]	[C/F]	[C/F]	[C/F]	[C/F]
1	1	Fehler	1,33	1,33	1,71	1,8	1,43
2	1,38	in der	1,36	1,36	0,9	1,83	1,37
3	1,67	Gewebe-	1	1	2,14	1,38	1,44
4	1,8	aufbereitung	0,91	0,91	3	1,83	1,69
5	1,27		1,13	1,13	3,16	2	1,74
6	1,08		1,33	1,33	2,5	2,14	1,68
7	2		0,88	0,88	1,63	1,13	1,30
8	1,33		1,86	1,86	1,33	1,33	1,54
9	1,44		1,29	1,29	1,88	1,43	1,47
10	1,28		1,25	1,25	1,6	1,71	1,42
11	1,36		1,08	1,08	2,2	1,23	1,39
12	1,81		0,92	0,92	3,25	2,17	1,81
13	1,36		0,58	0,58	2,4	1,25	1,23
14	1,1		1,54	1,54	2,29	1,57	1,61
15	1,3		1,4	1,4	1,57	2	1,53
16	1		1	1	2,57	1	1,31
17	1,88		1	1	2,83	1,13	1,57
18	1,25		1,3	1,3	1,5	1	1,27
19	2,14		1,33	1,33	2	2,4	1,84
20	1,63		1	1	1,71	2,4	1,55
Mittelwert	1,45		1,17	1,17	2,11	1,64	1,51
	±		±	±	±	±	±
	0,33		0,28	0,28	0,64	0,45	0,18

Tabelle 19: Kapillaranzahl pro Muskelfaser (C/F=capillary-to-fibre-ratio) im prästimulierten Musculus latissimus dorsi bei Burenziegen (B₁,B₃₋₆.) Angabe von Mittelwert und Standardabweichung.

Messfeld	B1	B2	B3	B4	B5	B6	gesamt
	[C/F]	[C/F]	[C/F]	[C/F]	[C/F]	[C/F]	[C/F]
1	2,17	Fehler	2	1,67	2,83	1,6	2,05
2	1	in der	1,86	1,11	3	1,92	1,78
3	1,8	Gewebe-	2	1,43	2,8	2,14	2,03
4	1,5	aufbereitung	1,44	0,9	3,29	1,73	1,77
5	1,63		1,3	1,45	2,71	2,2	1,86
6	1,86		2	1,5	1,57	2,44	1,87
7	2,33		1,3	1,07	2,67	1,5	1,77
8	1,2		1,71	1,4	3,5	1,5	1,86
9	2,33		1,44	1,43	5	1,4	2,32
10	2,29		2	1,4	3,8	1,4	2,18
11	2,17		1,22	1,67	3,57	1,29	1,98
12	2		2	2,1	3	1,55	2,13
13	1,63		2,38	1,9	2,75	2,09	2,15
14	2,33		2,4	1,62	4,75	2,1	2,64
15	1,57		2,5	1,25	3,17	1,7	2,04
16	2,33		1,63	1,47	4,4	2,29	2,42
17	1,86		1,67	1,44	3,5	2,25	2,14
18	1,13		1	1,13	2,71	2,44	1,68
19	1,63		1,5	1,28	4,2	1,7	2,06
20	2		3,33	1,4	4,8	2,89	2,88
Mittelwert	1,84		1,83	1,43	3,40	1,91	2,08
	±		±	±	±	±	±
	0,42		0,54	0,28	0,87	0,43	0,30

Tabelle 20: Kapillaranzahl pro Muskelfaser (C/F=capillary-to-fibre-ratio) im un- und prästimulierten Musculus latissimus dorsi bei Burenziegen (n=5). Angabe von Mittelwert, Signifikanzniveau und Veränderung der Kapillaranzahl in %.

	B1	B3	B4	B5	B6	gesamt
	[C/F]	[C/F]	[C/F]	[C/F]	[C/F]	[C/F]
Mittelwert unstimuliert	1,45 ± 0,33	1,17 ± 0,28	1,17 ± 0,28	2,11 ± 0,64	1,64 ± 0,45	1,51 ± 0,18
Mittelwert prästimuliert	1,84 ± 0,42	1,83 ± 0,54	1,43 ± 0,28	3,40 ± 0,87	1,91 ± 0,43	2,08 ± 0,30
Veränderung in %	27	56	22	61	16	38
Signifikanz	p≤0,05	p≤0,01	p≤0,05	p≤0,01	n.s.	p≤0,01

6.2 Veröffentlichungen

Kongressbeiträge

European Society for Surgical Research, 17.-20. Mai 2006, Rostock
Blood Flow, Oxygen tension and Capillary density in Electrically Pre-Stimulated Latissimus Dorsi Muscle -A Contribution for Muscular Cardiac Bioassist-
PO Schwarz, P Klapproth, M Großherr, E Kraatz, HH Sievers, NW Guldner
(Abstract 275)

36. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie, 11.-14. Februar 2007, Hamburg
Blood Flow, Oxygen Tension and Capillary Density in Electrically Prestimulated Latissimus Dorsi Muscle - Evaluations to Enhance Efficacy of Indirect Myocardrevascularization and Muscular Blood Pumps
PO Schwarz, NW Guldner, P Klapproth, M Großherr, R Eggers, E Kraatz, HH Sievers
(Abstract 148)

6.3 Genehmigung Tierexperimente

Die Genehmigung für die tierexperimentellen Untersuchungen erteilte die Abteilung Tierschutz des Umweltministeriums Schleswig-Holstein [Genehmigungsnummer: V252-722 41-122-6 (47-3/00)].

6.4 Danksagungen

Zuerst möchte ich besonders Herrn Prof. Dr. Norbert W. Guldner für das Überlassen des Themas danken. Die sehr gute Betreuung durch ihn möchte ich hier noch einmal besonders hervorheben. In Gesprächen gab er mir immer wieder Denkanstöße und motivierte mich bei Rückschlägen.

Weiterhin danke ich Frau Britta Keding, die mir bei ELISA-Problemen zur Seite stand und einige Zeit investierte, um diese zu lösen. Leider vergebens!

Außerdem möchte ich Herrn Dr. Ing. Peter Klapproth für die hervorragende technische Betreuung und seine Hilfe bei der Auswertung der Daten im Rahmen meiner Arbeit danken.

Ohne die Mitarbeit unseres Anästhesisten Dr. Martin Großherr wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen. Vielen Dank!

Ein weiterer Dank gilt zwei Personen aus dem Institut für Anatomie, zum einen sei Frau Lidija Gutjahr gedankt, da sie mir trotz ihrer knapp bemessenen Zeit bei der Anfertigung meiner histologischen Präparate behilflich war. Zum anderen möchte ich Herrn Dr. Reinhard Eggers danken, der mich in die Kunst des Kapillarenzählens eingewiesen hat und mir beim Berechnen der dazugehörigen Daten tatkräftig zur Seite stand.

Außerdem danke ich Frau Sabine Runge und meinem Vater, die beide als Lektoren fungierten.

6.5 Literaturverzeichnis

1. American Heart Association. Heart Disease and Stroke Statistics - 2005 Updates. *Dallas, Texas*, 2005
2. Acker MA: Clinical results with the Acorn cardiac restraint device with and without mitral valve surgery. *Semin.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 17:361-363, 2005
3. Acker MA, Bolling S, Shemin R, Kirklin J, Oh JK, Mann DL, Jessup M, Sabbah HN, Starling RC, Kubo SH: Mitral valve surgery in heart failure: insights from the Acorn Clinical Trial. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 132:568-77, 577, 2006
4. Acker MA, Hammond RL, Mannion JD, Salmons S, Stephenson LW: An autologous biologic pump motor. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 92:733-746, 1986
5. Acker MA, Hammond RL, Mannion JD, Salmons S, Stephenson LW: Skeletal muscle as the potential power source for a cardiovascular pump: assessment in vivo. *Science* 236:324-327, 1987
6. Adrian ED, Bronk DW: The discharge of impulses in motor nerve fibres. *J.Physiol.Lond.* 67:119-151, 1929
7. Ando J, Nomura H, Kamiya A: The effect of fluid shear stress on the migration and proliferation of cultured endothelial cells. *Microvasc.Res.* 33:62-70, 1987
8. Bailey WF, Jr., Magno MG, Buckman PD, DiMeo F, Langan T, Armenti VT, Mannion JD: Chronic stimulation enhances extramyocardial collateral blood flow after a cardiomyoplasty. *Ann.Thorac.Surg.* 56:1045-1052, 1993
9. Bakst AA, Boley SJ, Morse W, Loewe L: Experimental surgical treatment of occlusive coronary artery disease. I. Use of pedicled pectoral muscle grafts. *Angiology* 8:308-315, 1957
10. Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D: Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 87:3336-3343, 1996
11. Barron DJ, Etherington PJ, Winlove CP, Jarvis J, Salmons S, Pepper JR: Combination of prestimulation and delayed flap elevation: evidence for

- improved perfusion and oxygenation of the latissimus dorsi muscle for cardiomyoplastie. *Ann.Thorac.Surg.* 71:852-861, 2001
12. Barron DJ, Etherington PJ, Winlove CP, Jarvis JC, Salmons S, Pepper JR: Muscle transformation in cardiomyoplasty: the effect of conditioning and mobilisation on perfusion, oxygenation and fatigue resistance in the latissimus dorsi muscle. *Eur.J.Cardiothorac.Surg.* 13:588-598, 1998
 13. Barron DJ, Etherington PJ, Winlove CP, Pepper JR: Regional perfusion and oxygenation in the pedicled latissimus dorsi muscle flap: the effect of mobilisation and electrical stimulation. *Br.J.Plast.Surg.* 50:435-442, 1997
 14. Berridge MJ: The interaction of cyclic nucleotides and calcium in the control of cellular activity. *Adv.Cyclic.Nucleotide.Res.* 6:1-98, 1975
 15. Beyer, M. Indirekte Myokardrevaskularisation durch ein freies Skelettmuskeltransplantat. *Med. Habil. Schr. Ulm*, 1993
 16. Beyer M: Cardiomyopexy - current status of an indirect revascularization method. *Z.Kardiol.* 86 Suppl 1:125-132, 1997
 17. Beyer M, Beyer U, Mierdl S, Sirch J, von Behren H, Hannekum A: Indirect myocardial revascularization - an experimental study in the dog. *Eur.J.Cardiothorac.Surg.* 8:557-562, 1994
 18. Beyer M, Hoffer H, Beyer U, Mierdl S, Hannekum A: A cardiac assist device as blood supply in ischemic heart disease. *Int.J.Artif.Organs* 15:374-377, 1992
 19. Beyer M, Hoffer H, Eggeling T, Goertz A, Mierdl S, Hannekum A: Cardiomyoplasty to improve myocardial collateral blood supply as an alternative to transplantation in intractable angina. *J.Heart Lung Transplant.* 11:189-191, 1992
 20. Beyer M, Hoffer H, Eggeling T, Matt O, Beyer U, Hannekum A: Free skeletal muscle transplantation to an infarction area: an experimental study in the dog. *Microsurgery* 14:125-129, 1993
 21. Bhayana JN, Gage AA, Takaro T: Long-term results of internal mammary artery implantation for coronary artery disease: a controlled trial by the participants of the Veterans Administration Coronary Bypass Surgery Cooperative Study Group. *Ann.Thorac.Surg.* 29:234-242, 1980
 22. Brown MD, Egginton S, Hudlicka O, Zhou AL: Appearance of the capillary endothelial glycocalyx in chronically stimulated rat skeletal muscles in relation to angiogenesis. *Exp.Physiol.* 81:1043-1046, 1996

23. Buckman PD, Mannion JD, Magno M, DiMeo F, McHugh M: After a cardiomyoplasty, collaterals from skeletal muscle form to chronic ischemic myocardium. *Artif.Organs* 16:273-280, 1992
24. Buller AJ, Eccles JC, Eccles RM: Differentiation of fast and slow muscles in the cat hind limb. *J.Physiol.* 150:399-416, 1960
25. Buller AJ, Eccles JC, Eccles RM: Interactions between motoneurons and muscles in respect of the characteristic speeds of their responses. *J.Physiol.* 150:417-439, 1960
26. Carpentier A, Chachques JC: Myocardial substitution with a stimulated skeletal muscle: first successful clinical case. *Lancet* 1:1267, 1985
27. Carraro U, Rigatelli G, Rossini K, Barbiero M, Rigatelli G: Demand dynamic bio-girdling in heart failure: improved efficacy of dynamic cardiomyoplasty by LD contraction during aortic out-flow. *Int.J.Artif.Organs* 26:217-224, 2003
28. Chachques JC, Grandjean P, Schwartz K, Mihaileanu S, Fardeau M, Swynghedauw B, Fontaliran F, Romero N, Wisnewsky C, Perier P, .: Effect of latissimus dorsi dynamic cardiomyoplasty on ventricular function. *Circulation* 78:203-216, 1988
29. Chaudhry PA, Anagnostopouls PV, Mishima T, Suzuki G, Nair H, Morita H, Sharov VG, Alferness C, Sabbah HN: Acute ventricular reduction with the acorn cardiac support device: effect on progressive left ventricular dysfunction and dilation in dogs with chronic heart failure. *J.Card Surg.* 16:118-126, 2001
30. Chekanov VS, Maternowski MA, Eisenstein R, Hernandez I, Nikolaychik VV: Angiogenesis in the latissimus dorsi muscle using different regimens of electrical stimulation and pharmaceutical support. *ASAIO J.* 46:305-312, 2000
31. Chiu RC, Kochamba G, Walsh G, Dewar ML, Desrosiers C, Dionisopoulos T, Brady P, Ianzuzzo CD: Biochemical and functional correlates of myokardium-like skeletal muscle as a power source for cardiac assist device. *J.Card.Surg.* 4:171-179, 1989
32. Chiu RC, Walsh GL, Dewar ML, De Simon JH, Khalafalla AS, Ianzuzzo D: Implantable extra-aortic balloon assist powered by transformed fatigue-resistant skeletal muscle. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 94:694-701, 1987

33. Cho PW, Levin HR, Curtis WE, Tsitlik JE, DiNatale JM, Kass DA, Gardner TJ, Kunel RW, Acker MA: Pressure-volume analysis of changes in cardiac function in chronic cardiomyoplasty. *Ann.Thorac.Surg.* 56:38-45, 1993
34. Christ JE, Spira M: Application of the latissimus dorsi muscle to the heart. *Ann.Plast.Surg.* 8:118-121, 1982
35. Cmolik BL, Thompson DR, Sherwood JT, Geha AS, George DT: Increased coronary artery blood flow with aortomyoplasty in chronic heart failure. *Ann.Thorac.Surg.* 71:284-289, 2001
36. D'Amore PA, Thompson RW: Mechanisms of angiogenesis. *Annu.Rev.Physiol.* 49:453-464, 1987
37. Dawson JM, Hudlicka O: The effect of long-term activity on the microvasculature of rat glycolytic skeletal muscle. *Int.J.Microcirc.Clin.Exp.* 8:53-69, 1989
38. De Forrest JM, Hollis TM: Relationship between low intensity shear stress, antihistamine formation and aortic albumin uptake. *Exp.Mol.Pathol.* 32:217-225, 1980
39. Deutsche Stiftung Organtransplantation (DSO). Jahresbericht 2004. <http://www.DSO.de>.
40. Dewar ML, Drinkwater DC, Wittnich C, Chiu RC: Synchronously stimulated skeletal muscle graft for myocardial repair. An experimental study. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 87:325-331, 1984
41. Dewey CF, Jr., Bussolari SR, Gimbrone MA, Jr., Davies PF: The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress. *J.Biomech.Eng* 103:177-185, 1981
42. Egginton S, Hudlicka O: Early changes in performance, blood flow and capillary fine structure in rat fast muscles induced by electrical stimulation. *J.Physiol.* 515:265-275, 1999
43. Egginton S, Hudlicka O, Brown MD, Walter H, Weiss JB, Bate A: Capillary growth in relation to blood flow and performance in overloaded rat skeletal muscle. *J.Appl.Physiol.* 85:2025-2032, 1998
44. Egginton S, Zhou AL, Brown MD, Hudlicka O: Unorthodox angiogenesis in skeletal muscle. *Cardiovasc.Res.* 49:634-646, 2001
45. Eurotransplant, Lein Nederlande. Annual Report 2004. <http://transplant.org>.
46. Favaloro RG: Saphenous vein graft in the surgical treatment of coronary artery disease. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 41:178-185, 1969

47. Favaloro RG, Effler DB, Groves LK, Fergusson DJ, Lozada JS: Double internal mammary artery-myocardial implantation. Clinical evaluation of results in 150 patients. *Circulation* 37:549-555, 1968
48. Folkman J: Angiogenesis: initiation and control. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 401:212-227, 1982
49. Folkman J: Toward an understanding of angiogenesis: search and discovery. *Perspect.Biol.Med.* 29:10-36, 1985
50. Folkman J: How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? G.H.A. Clowes memorial Award lecture. *Cancer Res.* 46:467-473, 1986
51. Folkman J: Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat.Med.* 1:27-31, 1995
52. Folkman J, Greenspan HP: Influence of geometry on control of cell growth. *Biochim.Biophys.Acta* 417:211-236, 1975
53. Folkman J, Klagsbrun M: Angiogenic factors. *Science* 235:442-447, 1987
54. Folkman J, Moscona A: Role of cell shape in growth control. *Nature* 273:345-349, 1978
55. Form DM, Auerbach R: PGE2 and angiogenesis. *Proc.Soc.exp.Biol.Med.* 172:214-218, 1983
56. Fraser RA, Ellis EM, Stalker AL: Experimental angiogenesis in the chorio-allantoic membrane. *Bibl.Anat.* 25-27, 1979
57. Fronek K, Zweifach BW: Microvascular pressure distribution in skeletal muscle and the effect of vasodilation. *Am.J.Physiol.* 228:791-796, 1975
58. Geddes LA, Badylak SF, Wessale J, Janas W, Bourland JD, Tacker WA, Stevens L: The use of electrically stimulated skeletal muscle to pump blood. *Pacing Clin.Electrophysiol.* 13:344-362, 1990
59. Gospodarowicz D: Expression and control of vascular endothelial cells: proliferation and differentiation by fibroblast growth factors. *J.Invest Dermatol.* 93:39-47, 1989
60. Gospodarowicz D, Ferrara N, Schweigerer L, Neufeld G: Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocr.Rev.* 8:95-114, 1987
61. Greenbaum AR, Etherington PJ, Manek S, O'hare D, Parker KH, Green CJ, Pepper JR, Winlove CP: Measurements of oxygenation and perfusion in

- skeletal muscle using multiple microelectrodes. *J.Muscle Res.Cell Motil.* 18:149-159, 1997
62. Guldner NW, Eichstaedt HC, Klapproth P, Tilmans MH, Thuaudet S, Umbrain V, Ruck K, Wyffels E, Bruyland M, Sigmund M, .: Dynamic training of skeletal muscle ventricles. A method to increase muscular power for cardiac assistance. *Circulation* 89:1032-1040, 1994
 63. Guldner NW, Klapproth P, Fischer T, Rumpel E, Büchner I, Keller R, Klempien R, Krischer R, Noel R, Sievers HH: Functionally adapted stimulation patterns for a dynamic training of skeletal muscle ventrikles in adult goats. *BAM* 8:67-72, 1997
 64. Guldner NW, Klapproth P, Grossherr M, Brugge A, Sheikhzadeh A, Tolg R, Rumpel E, Noel R, Sievers HH: Biomechanical hearts: muscular blood pumps, performed in a 1-step operation, and trained under support of clenbuterol. *Circulation* 104:717-722, 2001
 65. Guldner NW, Klapproth P, Grossherr M, Stephan M, Rumpel E, Noel R, Sievers HH: Clenbuterol-supported dynamic training of skeletal muscle ventricles against systemic load: a key for powerful circulatory assist? *Circulation* 101:2213-2219, 2000
 66. Guldner NW, Tilmans MH, DeHaan H, Ruck K, Bressers H, Messmer BJ: Development and training of skeletal muscle ventricles with low preload. *J.Card Surg.* 6:175-183, 1991
 67. Hansen-Smith FM, Egginton S, Hudlicka O: Growth of arterioles in chronically stimulated adult rat skeletal muscle. *Microcirculation.* 5:49-59, 1998
 68. Hansen-Smith FM, Hudlicka O, Egginton S: In vivo angiogenesis in adult rat skeletal muscle: early changes in capillary network architecture and ultrastructure. *Cell Tissue Res.* 286:123-136, 1996
 69. Heits F, Wiedemann GJ, Jelkmann W: [Vascular endothelial growth factor VEGF stimulates angiogenesis in good and bad situations]. *Dtsch.Med.Wochenschr.* 123:259-265, 1998
 70. Herold G: *Innere Medizin* :205-216, 2004
 71. Hooper TL, Niinami H, Hammond RL, Lu H, Ruggiero R, Pochettino A, Stephenson LW: Skeletal muscle ventricles as left atrial-aortic pumps: short-term studies. *Ann.Thorac.Surg.* 54:316-322, 1992

72. Hoppeler H: Vascular growth in hypoxic skeletal muscle. *Adv.Exp.Med.Biol.* 474:277-286, 1999
73. Hudlicka O: Review lecture: What makes blood vessels grow? *J.Physiol.Lond.* 444:1-24, 1991
74. Hudlicka O: Is physiological angiogenesis in skeletal muscle regulated by changes in microcirculation? *Microcirculation.* 5:5-23, 1998
75. Hudlicka O, Brown M, Egginton S: Angiogenesis in skeletal and cardiac muscle. *Physiol. Rev.* 72:369-417, 1992
76. Hudlicka O, Price S: The role of blood flow and/or muscle hypoxia in capillary growth in chronically stimulated fast muscles. *Pflugers Arch.* 417:67-72, 1990
77. Hudlicka O, Tyler KR: The effect of long-term high-frequency stimulation on capillary density and fibre types in rabbit fast muscles. *J.Physiol.* 353:435-445, 1984
78. Hudlicka O, Tyler KR, Wright AJ, Ziada AM: Growth of capillaries in skeletal muscle. *Prog.Appl.Microcirc.* 5:44-61, 1984
79. Ianuzzo CD, Ianuzzo SE, Calfoun N, Field M, Locke M, Fernandez J, Chiu RC: Cardiomyoplasty: comparison of latissimus dorsi muscle of three large mammals with that of human. *J.Card.Surg.* 11:30-36, 1996
80. Jacobson JH, Suarez EL: Microsurgery in anastomosis of small vessels. *Surg.Forum* 11:243-252, 1960
81. Jussila L, Valtola R, Partanen TA, Salven P, Heikkila P, Matikainen MT, Renkonen R, Kaipainen A, Detmar M, Tschachler E, Alitalo R, Alitalo K: Lymphatic endothelium and Kaposi's sarcoma spindle cells detected by antibodies against the vascular endothelial growth factor receptor-3. *Cancer Res.* 58:1599-1604, 1998
82. Kantrowitz A, McKinnon WM: The experimental use of the diaphragm as an auxiliary myocardium. *Surg.Forum* 9:266-268, 1958
83. Kendall RL, Thomas KA: Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90:10705-10709, 1993
84. Kendall RL, Wang G, Thomas KA: Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 226:324-328, 1996

85. Kriet JM, Kaye MP: The registry of the international society for the heart and lung transplantation: eight official report 1991. *J.Heart Lung Transplant.* 10:491-498, 1991
86. Laitinen L: Griffonia simplicifolia lectins bind specifically to endothelial cells and some epithelial cells in mouse tissues. *Histochem.J.* 19:225-234, 1987
87. Langille BL, Reidy MA, Kline RL: Injury and repair of endothelium at sites of flow disturbances near abdominal aortic coarctations in rabbits. *Arteriosclerosis* 6:146-154, 1986
88. Lexell J, Jarvis J, Downham D, Salmons S: Quantitative morphology of stimulation-induced damage in rabbit fast-twitch skeletal muscles. *Cell Tissue Res.* 269:195-204, 1992
89. Lexell J, Jarvis J, Downham D, Salmons S: Stimulation-induced damage in rabbit fast-twitch skeletal muscles: a quantitative morphological study of the influence of pattern and frequency. *Cell Tissue Res.* 273:357-362, 1993
90. Loebe M, Hennig E, Muller J, Spiegelsberger S, Weng Y, Hetzer R: Long-term mechanical circulatory support as a bridge to transplantation, for recovery from cardiomyopathy, and for permanent replacement. *Eur.J.Cardiothorac.Surg.* 11 Suppl:18-24, 1997
91. Long WF, Williamson FB: Heparan structure and the modulation of angiogenesis. *Med.Hypotheses* 13:385-394, 1984
92. Lu H, Fietsam R, Jr., Hammond RL, Nakajima H, Mocek FW, Thomas GA, Ruggiero R, Nakajima H, Colson M, Stephenson LW: Skeletal muscle ventricles: left ventricular apex to aorta configuration. *Ann.Thorac.Surg.* 55:78-85, 1993
93. Magovern GJ, Heckler FR, Park SB, Christlieb IY, Magovern GJ, Jr., Kao RL, Benckart DH, Tullis G, Rozar E, Liebler GA, .: Paced latissimus dorsi used for dynamic cardiomyoplasty of left ventricular aneurysms. *Ann.Thorac.Surg.* 44:379-388, 1987
94. Mannion JD, Blood V, Bailey W, Bauer TL, Magno MG, DiMeo F, Epple A, Spinale FG: The effect of basic fibroblast growth factor on the blood flow and morphologic features of a latissimus dorsi cardiomyoplasty. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 111:19-28, 1996
95. Mannion JD, Buckman PD, Magno MG, DiMeo F: Collateral blood flow from skeletal muscle to normal myocardium. *J.Surg.Res.* 53:578-587, 1992

96. Mannion JD, Magno MG, Buckman PD, DiMeo F, Greene R, Bowers M, McHugh M, Menduke H: Acute electrical stimulation increases extramyocardial collateral blood flow after a cardiomyoplasty. *Ann.Thorac.Surg.* 56:1351-1358, 1993
97. Mannion JD, Stephenson LW: Potential uses of skeletal muscle for myocardial assistance. *Surg.Clin.North Am.* 65:679-687, 1985
98. Mathieu-Costello O, Agey PJ, Wu L, Hang J, Adair TH: Capillary-to-fiber surface ratio in rat fast-twitch hindlimb muscles after chronic electrical stimulation. *J.Appl.Physiol.* 80:904-909, 1996
99. Milkiewicz M, Brown MD, Egginton S, Hudlicka O: Association between shear stress, angiogenesis, and VEGF in skeletal muscles in vivo. *Microcirculation.* 8:229-241, 2001
100. Nakajima H, Niinami H, Hooper TL, Hammond RL, Nakajima HO, Lu H, Ruggiero R, Thomas GA, Mocek FW, Fietsam R, Jr., .: Cardiomyoplasty: probable mechanism of effectiveness using the pressure-volume relationship. *Ann.Thorac.Surg.* 57:407-415, 1994
101. Ootaki Y, Tsukube T, Okita Y: Girdling effect of adynamic cardiomyoplasty in a model of dilated cardiomyopathy. *Jpn.J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 50:104-108, 2002
102. Overgoor ML, Carroll SM, Papanicolau G, Carroll CM, Ustuner TE, Stremel RW, Anderson GL, Franken RJ, Kon M, Barker JH: Can angiogenesis induced by chronic electrical stimulation enhance latissimus dorsi muscle flap survival for application in cardiomyoplasty? *Plast.Reconstr.Surg.* 111:178-188, 2003
103. Park JE, Keller GA, Ferrara N: The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol.Biol.Cell* 4:1317-1326, 1993
104. Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R: Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 181:902-906, 1991
105. Pepper MS, Montesano R: Proteolytic balance and capillary morphogenesis. *Cell Differ.Dev.* 32:319-327, 1990

106. Poltorak Z, Cohen T, Sivan R, Kandelis Y, Spira G, Vlodaysky I, Keshet E, Neufeld G: VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. *J.Biol.Chem.* 272:7151-7158, 1997
107. Rakusan K, Turek Z: Protamine inhibits capillary formation in growing rat hearts. *Circ.Res.* 57:393-398, 1985
108. Rashin P: Diabetic regulation and its relation to microangiopathy. *Metabolism* 27:235-243, 1978
109. Renz-Polster H, Braun J: Basislehrbuch Innere Medizin. *Urban und Fischer* 2:78-86, 2001
110. Rigatelli G, Rigatelli G, Barbiero M, Cotogni A, Bandello A, Riccardi R, Carraro U: "Demand" stimulation of latissimus dorsi heart wrap: experience in humans and comparison with adynamic girdling. *Ann.Thorac.Surg.* 76:1587-1592, 2003
111. Rivilis I, Milkiewicz M, Boyd P, Goldstein J, Brown MD, Egginton S, Hansen FM, Hudlicka O, Haas TL: Differential involvement of MMP-2 and VEGF during muscle stretch- versus shear stress-induced angiogenesis. *Am.J.Physiol. Heart Circ.Physiol.* 283:1430-1438, 2002
112. Roberts WG, Palade GE: Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J.Cell Sci.* 108:2369-2379, 1995
113. Salmons S: An implantable muscle stimulator. *J.Physiol.* 188:13-14, 1967
114. Salmons S, Jarvis JC: The working capacity of skeletal muscle transformed for use in a cardiac assist role. Transformed muscle for cardiac assist. *Eds: Chiu RCJ, Bourgeois IM.Future Publishing NY:89-104, 1990*
115. Salmons S, Jarvis JC: Cardiac assistance from skeletal muscle: a critical appraisal of the various approaches. *Br.Heart J.* 68:333-338, 1992
116. Salmons S, Tang AT, Jarvis JC, Degens H, Hastings M, Hooper TL: Morphological and functional evidence, and clinical importance, of vascular anastomoses in the latissimus dorsi muscle of the sheep. *J.Anat.* 193:93-104, 1998
117. Salmons S, Vrbova G: Changes in the speed of mammalian fast muscle following longterm stimulation. *J.Physiol.* 192:39-40, 1967
118. Schweigerer L, Neufeld G, Friedman J, Abraham JA, Fiddes JC, Gospodarowicz D: Capillary endothelial cells express basic fibroblast

- growth factor, a mitogen that promotes their own growth. *Nature* 325:257-259, 1987
119. Seetharam L, Gotoh N, Maru Y, Neufeld G, Yamaguchi S, Shibuya M: A unique signal transduction from FLT tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor VEGF. *Oncogene* 10:135-147, 1995
 120. Senger DR, Van De WL, Brown LF, Nagy JA, Yeo KT, Yeo TK, Berse B, Jackman RW, Dvorak AM, Dvorak HF: Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev.* 12:303-324, 1993
 121. Sewell WH: The surgical treatment of coronary artery disease. *Am.Surg.* 25:560-566, 1959
 122. Sewell WH, Sones FM, Jr., Fish RG, Joyner JT, Effler DB: The pedicle operation for coronary insufficiency: Technique and preliminary results. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 49:317-329, 1965
 123. Shalaby F, Ho J, Stanford WL, Fischer KD, Schuh AC, Schwartz L, Bernstein A, Rossant J: A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell* 89:981-990, 1997
 124. Sharon N, Lis H: Lectins as cell recognition molecules. *Science* 246:227-234, 1989
 125. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E: Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359:843-845, 1992
 126. Shweiki D, Neeman M, Itin A, Keshet E: Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: implications for tumor angiogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92:768-772, 1995
 127. Skorjanc D, Jaschinski F, Heine G, Pette D: Sequential increases in capillarization and mitochondrial enzymes in low-frequency-stimulated rabbit muscle. *Am.J.Physiol.* 274:810-818, 1998
 128. Song J, Qi M, Kaul S, Price RJ: Stimulation of arteriogenesis in skeletal muscle by microbubble destruction with ultrasound. *Circulation* 106:1550-1555, 2002
 129. Sreter FA, Pinter K, Jolesz F, Mabuchi K: Fast to slow transformation of fast muscles in response to long-term phasic stimulation. *Exp.Neurol.* 75:95-102, 1982

130. Suzuki J, Gao M, Xie Z, Koyama T: Effects of the beta 2-adrenergic agonist clenbuterol on capillary geometry in cardiac and skeletal muscles in young and middle-aged rats. *Acta Physiol. Scand.* 161:317-326, 1997
131. Tamai S, Komatsu S, Sakamoto H, Sano S, Sasauchi N: Free muscle transplants in dogs, with microsurgical neurovascular anastomoses. *Plast.Reconstr.Surg.* 46:219-225, 1970
132. Tang AT, Jarvis JC, Hooper TL, Salmons S: Observation and basis of improved blood flow to the distal latissimus dorsi muscle: a case for electrical stimulation prior to grafting. *Cardiovasc.Res.* 40:131-137, 1998
133. Tang AT, Jarvis JC, Hooper TL, Salmons S: Cardiomyoplasty: the benefits of electrical prestimulation of the latissimus dorsi muscle in situ. *Ann.Thorac.Surg.* 68:46-51, 1999
134. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Amano K, Kishimoto Y, Yoshimoto K, Akashi H, Shimada K, Iwasaka T, Imaizumi T: Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 360:427-435, 2002
135. Termet H, Chalencon JL, Estour E, Gaillard P, Favre JP: [Transplantation on the myocardium of a striated muscle stimulated by a pacemaker]. *Ann.Chir Thorac.Cardiovasc.* 5:260-263, 1966
136. Trainini J, Barisani JC, Cabrera Fischer EI, Chada S, Christen AI, Elencwajg B: Chronic aortic counterpulsation with latissimus dorsi in heart failure: clinical follow-up. *J.Heart Lung Transplant.* 18:1120-1125, 1999
137. Unemori EN, Ferrara N, Bauer EA, Amento EP: Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *J.Cell Physiol.* 153:557-562, 1992
138. Vineberg AM: Development of anastomosis between the coronary vessels and a transplanted internal mammary artery. *J.Thorac.Surg.* 18:839-50, 1949
139. Vlodavsky I, Folkman J, Sullivan R, Fridman R, Ishai-Michaeli R, Sasse J, Klagsbrun M: Endothelial cell-derived basic fibroblast growth factor: synthesis and deposition into subendothelial extracellular matrix. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 84:2292-2296, 1987
140. Zhang HT, Craft P, Scott PA, Ziche M, Weich HA, Harris AL, Bicknell R: Enhancement of tumor growth and vascular density by transfection of

vascular endothelial cell growth factor into MCF-7 human breast carcinoma cells. *J.Natl.Cancer Inst.* 87:213-219, 1995

141. Ziada AM, Hudlicka O, Tyler KR, Wright AJ: The effect of long-term vasodilatation on capillary growth and performance in rabbit heart and skeletal muscle. *Cardiovasc.Res.* 18:724-732, 1984

6.6 Curriculum Vitae von Philipp Otto Schwarz

Geburtsdatum:	16.01.1978	
Geburtsort:	Bad Segeberg	
Adresse:	Große Gröpelgrube 25 23552 Lübeck	
Familienstand:	ledig	
Schulische		
Laufbahn:	1984	Einschulung Grundschule, Neuengörs
	1988	Wechsel auf das Städtische Gymnasium Bad Segeberg
	1997	Abitur
Ersatzdienst:	1997-98	Zivildienst in einer Einrichtung des Deutschen Kinderschutzbundes, Bad Oldesloe
Ausbildung:	1998	Ausbildung zum Rettungssanitäter, Timmendorfer-Strand
	1999	Vollzeitbeschäftigung als Rettungs- sanitäter, Bad Oldesloe
	1999-2002	Teilzeitbeschäftigung als Rettungs- sanitäter, Bad Oldesloe
Universitäre		
Ausbildung:	1999	Beginn Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
	2001 Herbst	Physikum
	2002	Beginn der experimentellen Doktorarbeit in der Klinik für Herzchirurgie des UK S-H, Campus Lübeck
	2002 Herbst	1. Staatsexamen
	2002-04	Extrawachen (pflegerischer Dienst) UK S-H, Campus Lübeck
	2005 Frühjahr	2. Staatsexamen
	2006 Frühjahr	3. Staatsexamen, Approbation als Arzt
Beruf:	2006 Herbst	Assistenzarzt für Innere Medizin am Lehrkrankenhaus -Klinikum Neustadt-