

Aus der Klinik für Kardiovaskuläre Chirurgie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. A. Lichtenberg

# **Herzfrequenzvariabilität nach Infarkt und nach bradykarden Substanzen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Friederike Barbara Thomer

2010

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent: Prof. Dr. rer. nat. J. D. Schipke

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. A. Gödecke

*Meiner Familie*



## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Jochen D. Schipke danke ich ganz herzlich für die Überlassung des interessanten Themas und die wissenschaftliche Betreuung am Institut der experimentellen Chirurgie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Vor allem für seine stets freundliche Unterstützung, seine kritischen Ratschläge und seine Betreuung über seine Tätigkeit am Institut hinaus gilt ihm mein besonderer Dank. Danken möchte ich auch dem Korreferent Prof. Dr. rer. nat. A. Gödecke für seine Zweitkorrektur.

Bei Herrn Dr. med. Attyla Drabik und Frau Natalie Filmann bedanke ich mich herzlich für ihre unermüdliche Hilfe in statistischen Fragen. Ihre große Geduld und Kompetenz ermöglichte mir die Umsetzung statistischer und methodischer Fragestellungen.

Ein großes Dankeschön für die freundschaftliche Zusammenarbeit am Institut und die Unterstützung vor Ort gilt Frau Martina Stuff.

Ganz besonders möchte ich Frau Dr. med. Svenja Caspers und meiner Schwester Frau Dr. med. vet. Charlotte Leiber-Schotte für ihre tatkräftige Unterstützung danken. Ihre kritischen Ratschläge und ihre fachliche Kompetenz haben mich sehr inspiriert und angespornt. Außerdem danke ich Herrn Dr. med. vet. Ulrich Schotte für seine Hilfe bei allen computertechnischen Fragen.

Ein großer Dank gilt meinen Eltern, Frau Dr. med. Christa Leiber-Willemsen und Herrn Dr. iur. Kurt Leiber. Ihre liebevolle und unermüdliche Unterstützung ermöglichte mir das lang ersehnte Medizinstudium. Besonders möchte ich mich bei Ihnen und auch bei meinen Schwiegereltern, Frau Margret und Herrn Hans Thomer für die Betreuung unserer Kinder bedanken, ohne die eine Fertigstellung der Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

Den größten Dank schulde ich meinem lieben Mann Dr. iur. Dominik Thomer. Er hat mir stets zur Seite gestanden, immer Verständnis gehabt, mich liebevoll unterstützt und stets motiviert meine Dissertation zu vollenden.

Nicht (mehr) zu kurz kommen sollen auch an dieser Stelle meine beiden Töchter Johanna und Franziska. Sie haben (fast immer) ihre „Fremdbetreuung“ gelassen genommen und die Mama am Computer arbeiten lassen. Ich danke Euch dafür.



## Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Herzfrequenzvariabilität .....	2
1.1.1 Definition .....	2
1.1.2 Geschichtliche Grundlage .....	2
1.1.3 Herzfrequenz und Herzfrequenzvariabilität .....	3
1.2 Maße des Zeit-Bereiches zur Charakterisierung der Herzfrequenzvariabilität .....	6
1.3 Maße des Frequenz-Bereiches zur Charakterisierung der Herzfrequenzvariabilität .....	8
1.3.1 Spektralkomponenten der Kurzzeit-Aufzeichnungen .....	10
1.3.2 Spektralkomponenten der Langzeit-Aufzeichnungen .....	11
1.4 Betablocker .....	12
1.4.1 Wirkmechanismus .....	12
1.5 I <sub>f</sub> -Kanalblocker .....	14
1.5.1 Wirkmechanismus von Ivabradin .....	15
1.5.2 Nebenwirkungen von Ivabradin .....	16
1.6 Ziel der Studie .....	17
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>19</b>
2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen .....	19
2.1.1 Studienablauf .....	19
2.1.2 Versuchstiergruppen .....	20
2.2 Erste Operation zur Koronarligatur .....	21
2.2.1 Narkose und Einleitung .....	21
2.2.2 In-situ-Messungen .....	21
2.2.3 Setzen der Myokardischämie .....	22
2.2.4 Blutgasanalyse .....	22
2.3 Zweite Operation vier Wochen nach Koronarligatur .....	22
2.3.1 Narkose und Einleitung .....	23
2.3.2 Chirurgische Eingriffe und in-situ-Messungen .....	23
2.3.3 Blutgasanalyse .....	23
2.4 Datenregistrierung .....	24
2.4.1 Hämodynamische Größen .....	24
2.4.2 Parameter der Herzfrequenzvariabilität .....	25
2.5 Berechnungen und Statistik .....	26
2.5.1 Boxplot .....	27
2.5.2 Mann-Whitney-U-Test und Kruskal-Wallis-Test .....	27
2.5.3 Mixed-effects-Modell .....	28

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>31</b>
3.1	Verstorbene Tiere .....	31
3.2	Deskriptive Beschreibung der Daten .....	31
3.2.1	Herzfrequenz.....	32
3.2.2	Maximaler linksventrikulärer Druck.....	33
3.2.3	Standardabweichung der NN-Intervalle.....	34
3.2.4	Quadratwurzel des Mittelwertes der Summe der quadrierten Differenzen zwischen benachbarten NN-Intervallen (RMSSD) .....	35
3.3	Normalverteilung.....	36
3.4	Kruskal-Wallis-Test auf Homogenität zum Kontrollzeitpunkt ( $T_1B_0$ ) .....	42
3.5	Mann-Whitney-U-Test und Kruskal-Wallis-Test: Unterschiede bei den verschiedenen Gruppen zu den Zeitpunkten Sham-Manöver/Ligatur ( $T_1B_1$ ), nach erster Medikamentengabe ( $T_1B_2$ ) und nach 4-wöchiger Therapie ( $T_2B_3$ ) in Relation zum Kontrollzeitpunkt ( $T_1B_0$ ) .....	42
3.5.1	Zeitpunkt $T_1B_1$ (Sham-Manöver/Ligatur) minus $T_1B_0$ (Kontrollzeitpunkt) ...	42
3.5.2	Zeitpunkt $T_1B_2$ (erste Medikamentengabe) minus $T_1B_0$ (Kontrollzeitpunkt) .....	42
3.5.3	Zeitpunkt $T_2B_3$ (nach vier Wochen Medikamentengabe) minus $T_1B_0$ (Kontrollzeitpunkt) .....	43
3.6	Mixed-effects-Modell.....	43
3.6.1	Herzfrequenz.....	43
3.6.2	logSDNN .....	46
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>51</b>
4.1	Herzfrequenz .....	51
4.1.1	Betablocker .....	51
4.1.2	$I_f$ -Kanal-Blocker .....	52
4.1.3	Sham-Manöver.....	55
4.2	Maximaler linksventrikulärer Druck.....	55
4.2.1	Betablocker .....	55
4.2.2	$I_f$ -Kanal-Blocker .....	56
4.3	Herzfrequenzvariabilität: logSDNN und RMSSD .....	56
4.3.1	Betablocker .....	57
4.3.2	Ivabradin .....	58
4.4	Methodenkritik .....	59
4.5	Offene Fragen und Ausblick.....	61
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>65</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>67</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>77</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Die wichtigsten Todesursachen in den letzten 120 Jahren (Bundesamt für Statistik, Schweiz) .....	1
Abb. 2:	Rhythmische Aktivität in Zellen des Sinusknotens; modifiziert nach Craven und Zagotta [2006] .....	4
Abb. 3:	If-Kanal: Schlüsselfaktor der Herzfrequenz; modifiziert nach DiFrancesco und Camm [2004].....	5
Abb. 4:	EKG mit Darstellung eines RR-Intervalles (NN-Intervall = normal to normal interval) Internet.....	6
Abb. 5:	Spektrale Leistungsdichte (PSD) mit den dazugehörigen Frequenz- bereichen bei Kurzzeit-Aufzeichnungen; modifiziert nach Kleiger et al. [2005] .....	9
Abb. 6:	Spektrale Leistungsdichte (PSD) mit den dazugehörigen Frequenz- bereichen bei Langzeit-Aufzeichnungen; modifiziert nach Kleiger et al. [2005] .....	9
Abb. 7:	Hämodynamische Effekte der $\beta$ -Blocker; modifiziert nach Karow und Lang-Roth [2006] .....	14
Abb. 8:	Spezifische Bindung von Ivabradin am $I_f$ -Kanal (links), Abhängigkeit des Ionenstroms (pA) von der Zeit (s) bei einer Ivabradindosierung von 3 $\mu$ M (rechts) modifiziert nach Schulz [2006] .....	16
Abb. 9:	Gruppeneinteilung und Versuchsablauf .....	20
Abb. 10:	Beispiel für einen Boxplot .....	27
Abb. 11:	Anzahl und Zeitpunkt der verstorbenen Tiere .....	31
Abb. 12:	Herzfrequenz (HF) während der verschiedenen Messzeitpunkte.....	32
Abb. 13:	Maximaler linksventrikulärer Druck ( $LVP_{max}$ ) zu den verschiedenen Mess- zeitpunkten .....	33
Abb. 14:	Standardabweichung der NN-Intervalle (SDNN) zu den verschiedenen Messzeitpunkten.....	34
Abb. 15:	Quadratwurzel des Mittelwertes der Summe der quadrierten Differenzen zwischen benachbarten NN-Intervallen [RMSSD] zu den verschiedenen Messzeitpunkten.....	35
Abb. 16:	dsHF [1/min] aller Versuchsgruppen zum Kontrollzeitpunkt. ....	37
Abb. 17:	logSDNN [ms] aller Versuchsgruppen zum Kontrollzeitpunkt.....	38
Abb. 18:	RMSSD aller Versuchsgruppen zum Kontrollzeitpunkt .....	40
Abb. 19:	$LVP_{max}$ aller Versuchsgruppen zum Kontrollzeitpunkt. ....	41
Abb. 20:	HF [1/min] der einzelnen Versuchstiere der verschiedenen Versuchsgruppen .....	44
Abb. 21:	HF [1/min] im Modell 3 (Mixed-effects-Modell) .....	46
Abb. 22:	logSDNN der einzelnen Versuchstiere der verschiedenen Versuchsgruppen .....	47
Abb. 23:	logSDNN im Modell 1 (Mixed-effects-Modell). ....	49



## Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Übersicht der Variablen der Kurzzeit-Aufzeichnungen (überwiegend 5 min-Intervalle) .....	10
Tab. 2:	Übersicht der Variablen der Langzeit-Aufzeichnungen (24-h).....	10
Tab. 3:	Übersicht über die Anzahl der Versuchstiere (EKG- und computergestützte Daten), je nach Untersuchung. ....	20
Tab. 4:	Übersicht über die Anzahl der Tiere mit verfügbaren, computergestützten Daten.....	21
Tab. 5:	vier Messzeitpunkte der Datenauswertung .....	24
Tab. 6:	Grenzen zur Erfassung von ektopten Schlägen, Artefakten und normalen Schlägen (ms) in Bezug zur Herzfrequenz (/min).....	25
Tab. 7:	Errechnete Parameter der Herzfrequenzvariabilität .....	25
Tab. 8:	Auswertung (dsHF und logSDNN-Werte) der Placebo-, Sham-, $\beta$ -Blocker- und Ivabradin-Gruppe miteinander zu den folgenden Zeitpunkten:.....	26
Tab. 9:	Übersicht der dsHF der vier Versuchsgruppen zum Kontrollzeitpunkt.....	36
Tab. 10:	Übersicht der logSDNN aller Versuchsgruppen zum Kontrollzeitpunkt .....	38
Tab. 11:	Übersicht RMSSD aller Versuchsgruppen zum Kontrollzeitpunkt .....	39
Tab. 12:	Übersicht der $LVP_{\max}$ aller Versuchsgruppen zum Kontrollzeitpunkt .....	41
Tab. 13:	Senkung der Herzfrequenz durch spezifisch bradykarde Substanzen. ....	53



## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A.	Arteria
AC	Adenylylcyclase
AIC	Akaike information criterion
AUS	Australien
Beta-Gruppe	Betablocker-Gruppe
$\beta$ -Blocker	Betablocker
$\beta$ -Rezeptoren	Beta-Rezeptoren
bzw.	beziehungsweise
$\text{Ca}^{2+}$	Kalzium
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CIBIS-II	Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II
D	Deutschland
DK	Dänemark
dsHF	durchschnittliche Herzfrequenz
EKG	Elektrokardiogramm
FFT	Fast Fourier Transformation
HCN-Kanäle	hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-modulated channels
HF	Herzfrequenz
HFr	high frequency
HFV	Herzfrequenzvariabilität
I	Italien
I.E.	internationale Einheiten
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
$I_f$ -Kanal	Funny-channel
Iva-Gruppe	Ivabradin-Gruppe
J	Joule
$\text{K}^+$	Kalium
kg	Kilogramm
LF	low frequency
LF/HF	Verhältnis von LF ( $\text{ms}^2$ ) / HF ( $\text{ms}^2$ )
log	logarithmiert
$\text{LVP}_{\text{max}}$	maximaler linksventrikulärer Druck
MERIT-HF	Metoprolol CR/Zok Randomized Intervention Trial in Congestive Heart Failure
mg	Milligramm
MPIP	Multi-Center-Post-Infarction-Program
ms	Millisekunden
NaCl	Natriumchlorid
NN50	die Anzahl der Paare benachbarter NN-Intervalle, die mehr als 50 ms voneinander in der gesamten Aufzeichnung abweichen
NN-Intervalle	normal to normal Intervalle
Nr.	Nummer

O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OP	Operation
pCO <sub>2</sub>	Kohlendioxidpartialdruck
Pla-Gruppe	Placebo-Gruppe
pNN50	der Prozentsatz der Intervalle mit mindestens 50 ms Abweichungen vom vorausgehenden Intervall
p.o.	per os
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
PSD	power spectral density
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RMSSD	Quadratwurzel des Mittelwertes der Summe der quadrierten Differenzen zwischen benachbarten NN-Intervallen
s.c.	subkutan
SDNN	Standardabweichung der NN-Intervalle
ULF	ultra low frequency
USA	United States of America
V.	Vena
VLF	very low frequency
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel

## 1 Einleitung

In den letzten 130 Jahren hat ein starker Wandel im Hinblick auf die Todesursachen des Menschen stattgefunden. Während Anfang des letzten Jahrhunderts vor allem Infektionskrankheiten wie Tuberkulose, Pocken und Masern die Haupttodesursachen darstellten, stirbt heute jeder Zweite an den Folgen einer Herz-Kreislauf-Erkrankung (Abb. 1).

Heutzutage sind bei beiden Geschlechtern in den meisten Ländern Europas kardiovaskuläre Erkrankungen die Haupttodesursache und der Grund für Krankenhausaufenthalte [Madsen et al., 2007]. Die Hauptformen der kardiovaskulären Erkrankungen sind die chronische ischämische Herzkrankheit, akuter Myokardinfarkt und die Herzinsuffizienz.

Trotz ständiger Fortschritte und Neuentwicklungen der medizinischen und chirurgischen Therapieformen starben im Jahr 2007 laut Statistischem Bundesamt Deutschland 358.684 Menschen (43 %) an Krankheiten des Kreislaufsystems, gefolgt von Krebserkrankungen (217.289 Menschen; 26 %). Dies zeigt, dass weitere Forschung im Gebiet der kardiovaskulären Erkrankungen nötig ist, um diesem Trend entgegenzuwirken.

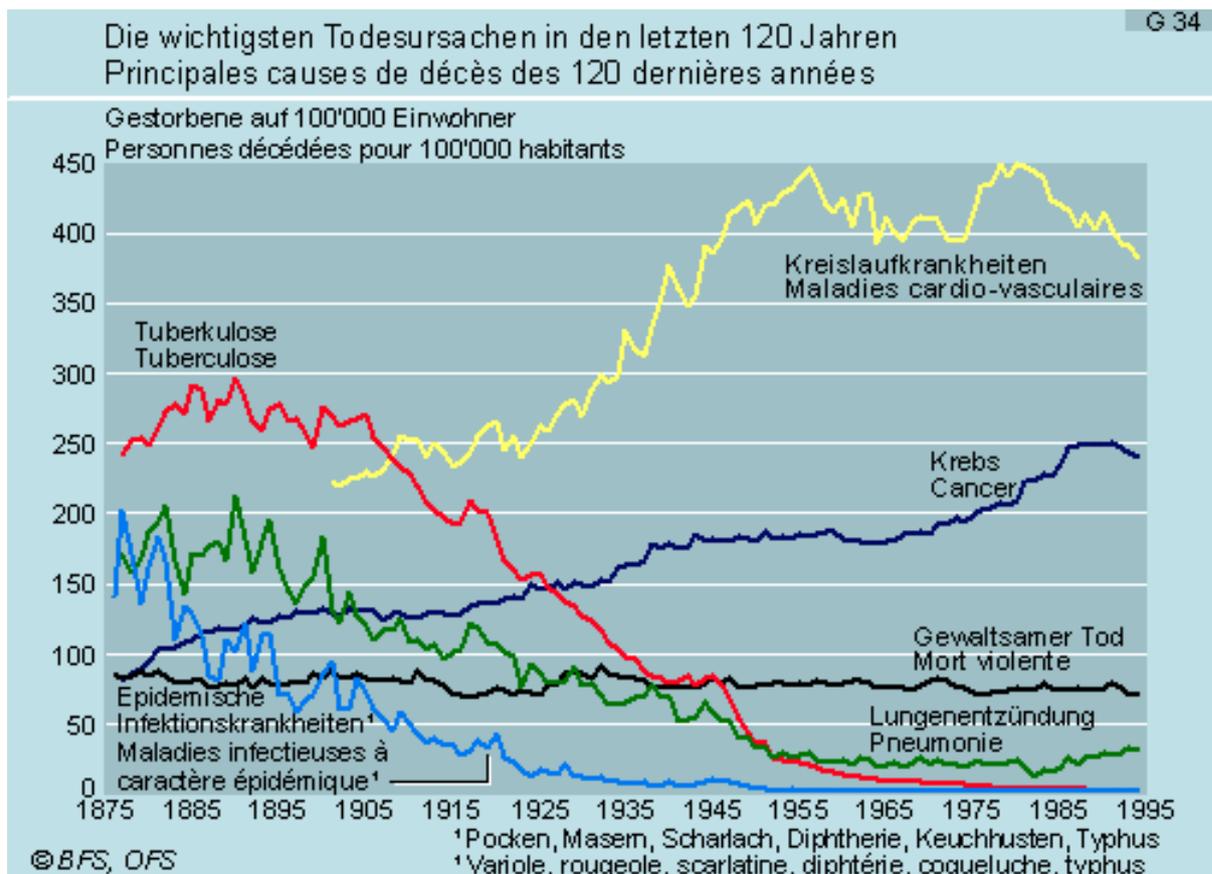


Abb. 1: Die wichtigsten Todesursachen in den letzten 120 Jahren (Bundesamt für Statistik, Schweiz)

## 1.1 Herzfrequenzvariabilität

### 1.1.1 Definition

Der Abstand zwischen zwei Herzschlägen wird als die Zeit zwischen dem Beginn zweier Kontraktionen der Herzkammern definiert. Dieser Beginn der Kammerkontraktion erscheint im Elektrokardiogramm (EKG) als ausgeprägte R-Zacke. Der Abstand zwischen zwei aufeinander folgenden R-Zacken wird daher als RR-Intervall bezeichnet. Das gemittelte RR-Intervall lässt sich in die Herzfrequenz (HF) umrechnen. Die realen RR-Intervalle schwanken um diesen Mittelwert, wobei die Abweichungen sich von Schlag zu Schlag verändern können; dies bezeichnet man als Herzfrequenz- oder Herzratenvariabilität.

Als Einflussgrößen gelten Körperlage, Alter, Geschlecht, Atmung und Trainingszustand, Tageszeit, Medikamente, Valsalva- und ähnliche Manöver [van Ravenswaaij-Arts, 1993; Tsuji et al., 1994; Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology, 1996; Kleiger et al., 2005].

### 1.1.2 Geschichtliche Grundlage

Zur Einschätzung von Erkrankungen des Herzens wurde die Herzfrequenz (HF) seit jeher als Beurteilungskriterium herangezogen; die Variabilität der HF ist ein Parameter der Neuzeit.

Bei einer fetalen Notlage kommt es zu einer Änderung der Intervalle zwischen den einzelnen Herzschlägen [Hon und Lee, 1965], bevor eine merkbare HF-Änderung sichtbar wird. Wolf et al. [1978] zeigten erstmalig, dass ein Zusammenhang zwischen einer herabgesetzten Herzfrequenzvariabilität (HFV) und einem erhöhten Risiko der Mortalität nach Myokardinfarkt besteht. Nachdem es 1981 durch Akselrod et al [1981] zu einer Einbeziehung von Leistungsspektralanalysen der Herzfrequenzschwankungen und zur quantitativen Bewertung der Schlag-zu-Schlag Herz-Kreislauf-Steuerung kam, wurde die klinische Bedeutung der HFV in den späten 80er Jahren zunehmend deutlicher.

Es besteht Einigkeit, dass bei Postmyokardinfarkt-Patienten eine reduzierte HFV verbunden mit einer erhöhten sympathischen Aktivität und einer verringerten vagalen Modulation einen prädisponierenden Faktor für eine myokardiale Ischämie und tödliche Arrhythmien darstellt [Kleiger et al., 1987, Malik und Camm, 1993, La Rovere et al., 2001]. Die HFV ist ein starker und unabhängiger Vorhersagewert der Mortalität nach einem Herzinfarkt [Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology, 1996]. Möglicherweise steuert die autonome Imbalance, diagnostiziert durch erhöhte HFV-Indizes und eine beeinträchtigte links-

ventrikuläre Funktion, einen proarrhythmogenen Effekt bei, welcher bei Postmyokardinfarkt-Patienten zu schlechteren Therapieergebnissen führte [Nogami et al., 2005].

Heutzutage ist die Beurteilung der HFV im klinischen Alltag noch kein Standard, ihr Indikationsbereich wird aber ständig erweitert. Laut Kleiger et al. [2005] wird die HFV-Analyse genutzt, um die autonome Funktion abzuschätzen, und die Analyse dient als Risikostratifizierung bei einer Reihe kardialer Funktionsstörungen insbesondere Herzinfarkt, Kardiomyopathien, kongestive Herzinsuffizienz, Patienten mit Herzklappendefekten und Herztransplantation und nicht-kardialer Funktionsstörungen wie Hirnschlag, Multiple Sklerose, Endstadium bei Nierenerkrankungen, neonatalem Distress und Diabetes mellitus.

Aktuell existiert ein breites Forschungsspektrum zur Herzfrequenzvariabilität, das vorwiegend auf vier Bereiche konzentriert ist:

- **klinischer Bereich:**  
Risikostratifizierung und Gesundheitsprognose mit Parametern der HFV,
- **rehabilitative Medizin:**  
klassische und nichtlineare HFV-Methoden für die Prognose- und Leistungsobjektivierung,
- **Stressmedizin und Psychophysiologie:**  
HFV-Biofeedback,
- **Sport- und Trainingswissenschaften:**  
Leistungsdiagnostik und Belastungssteuerung.

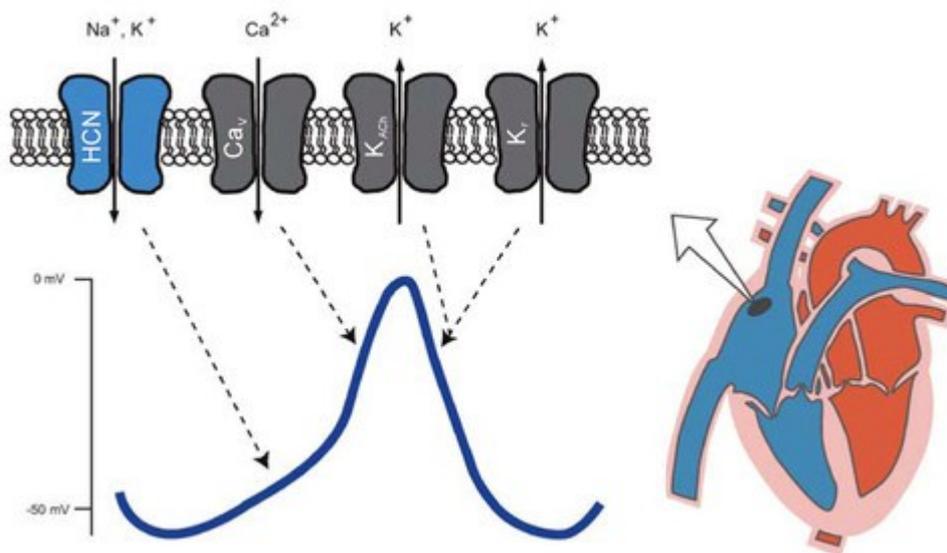
### 1.1.3 Herzfrequenz und Herzfrequenzvariabilität

Die Regulation der HF und der HFV unterliegt dem autonomen Nervensystem. Die HF beruht auf der spontanen elektrischen Schrittmacheraktivität des Sinusknotens. Die rhythmischen Aktionspotentiale breiten sich über das Erregungsleitungssystem des Herzens aus und lösen myokardiale Kontraktionen aus [DiFrancesco und Camm, 2004]. Das Aktionspotential ist von verschiedenen Ionenströmen abhängig, wobei vor allem der Ionenstrom über den  $I_f$ -Kanal (funny-channel) für die Variabilität der HF verantwortlich gemacht wird [DiFrancesco, 2006].

Nach dem Überschreiten eines bestimmten Schwellenwertes ( $\sim -40$  mV) des Membranpotentials kommt es zur Öffnung spannungsabhängiger Calcium-Kanäle ( $Ca_v$ -Kanäle), resultierend in einem  $Ca^{2+}$ -Einstrom in die Zelle und Ausbildung eines Aktionspotentials. Daraufhin öffnen sich spannungsabhängige Kalium-Kanäle, die durch einen  $K^+$ -Auswärtsstrom die Zelle repolarisieren und anschließend sogar hyperpolarisieren. Durch diese Hyperpolarisation öffnen sich die spannungsabhängigen  $I_f$ -Kanäle (auch

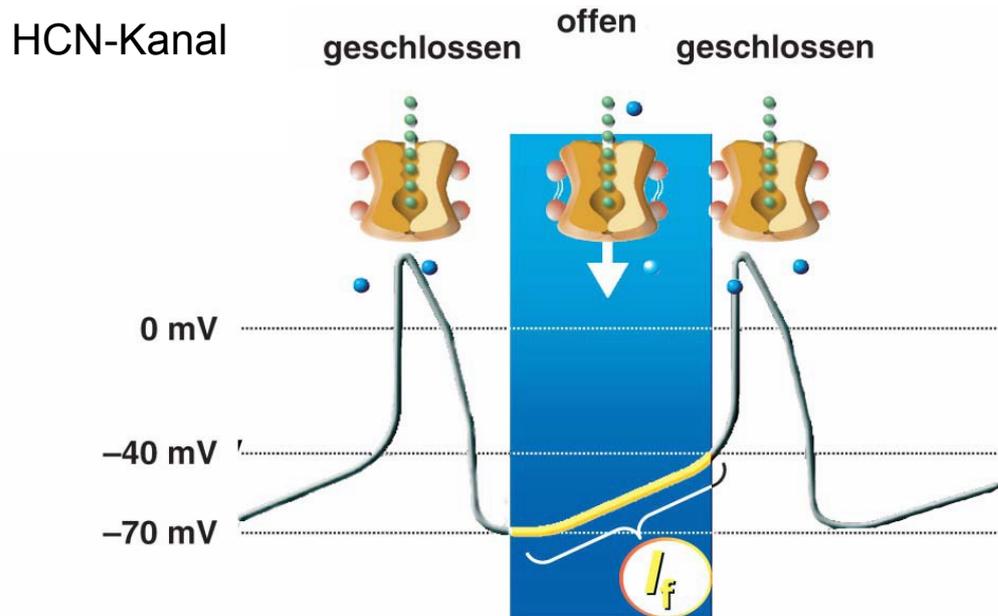
HCN-Kanäle genannt; hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-modulated channels), die einen Natrium- und  $K^+$ -Einwärtsstrom tragen, der so lange zu einer langsamen diastolischen Depolarisation führt, bis der Schwellenwert erneut erreicht und ein weiteres Aktionspotential ( $Ca^{2+}$ -Einstrom) ausgelöst wird (Abb. 2).

Es gibt vier HCN-Kanal-Subtypen, die in unterschiedlicher Ausprägung am Herzen und im Gehirn und der Retina vorliegen.  $HCN_4$  ist die am häufigsten exprimierte Form am Sinusknoten,  $HCN_1$  und  $HCN_2$  sind deutlich weniger häufig vertreten [Borer und Heuzey, 2008]. Während  $HCN_1$  vor allem in der Retina vertreten ist, ist die exakte Lokalisation von  $HCN_3$  noch nicht klar, in jedem Falle wird der Kanal aber im Gehirn und nicht im Sinusknoten exprimiert [Stieber, 2008]. Ausschließlich durch den  $I_f$ -Kanal werden die Anstiegssteilheit der diastolischen Depolarisationskurve und damit die Herzfrequenz bestimmt [Schulz, 2006].



**Abb. 2:** Rhythmische Aktivität in Zellen des Sinusknotens: HCN=hyperpolarisationsaktivierter und zyklisch Nukleotid-gesteuerter Kanal;  $Ca_v$ = spannungsabhängiger  $Ca^{2+}$ -Kanal;  $K_{ACh}$  und  $K_r$ = zwei  $K^+$ -Kanäle; modifiziert nach Craven und Zagotta [2006]

Der Einfluss des autonomen Nervensystems auf die HF und damit die HFV liegt vor allem in der Modulation des  $I_f$ -Kanals (HCN-Kanal) und damit in der Dauer der langsamen diastolischen Depolarisation (Abb. 3).



**Abb. 3:**  $I_f$ -Kanal: Schlüsselfaktor der Herzfrequenz; modifiziert nach DiFrancesco und Camm [2004]

Der Einfluss des Parasympathikus auf Herz und Kreislauf beruht überwiegend auf der Freisetzung von Acetylcholin durch den Nervus vagus. Die Stimulation der muskarinischen Rezeptoren führt zu einer Hemmung der Adenylylcyclase (AC), so dass die intrazelluläre cyclische Adenosinmonophosphat (cAMP)-Konzentration (= second messenger der  $I_f$ -Modulation) sinkt. Dies führt zu einer Verlangsamung der langsamen diastolischen Depolarisation und einer Reduktion der HF.

Die sympathische Aktivierung umgekehrt bewirkt über die  $\beta$ -adrenerge Stimulation eine verstärkte Aktivierung der Adenylylcyclase, welche für eine höhere intrazelluläre cAMP-Konzentration und damit eine direkte Bindung am  $I_f$ -Kanal sorgt [DiFrancesco, 2006]. Dies bewirkt eine Stimulierung des Schrittmacherstromes ( $I_f$ ) in den Schrittmacherzellen, der zu einer Beschleunigung der langsamen diastolischen Depolarisation führt und die HF erhöht [Büter, 2006; Borer und Heuzey, 2008]. Dabei gilt die Vermutung, dass cAMP am geöffneten  $I_f$ -Kanal eine höhere Bindungsaffinität als am geschlossenen  $I_f$ -Kanal hat.

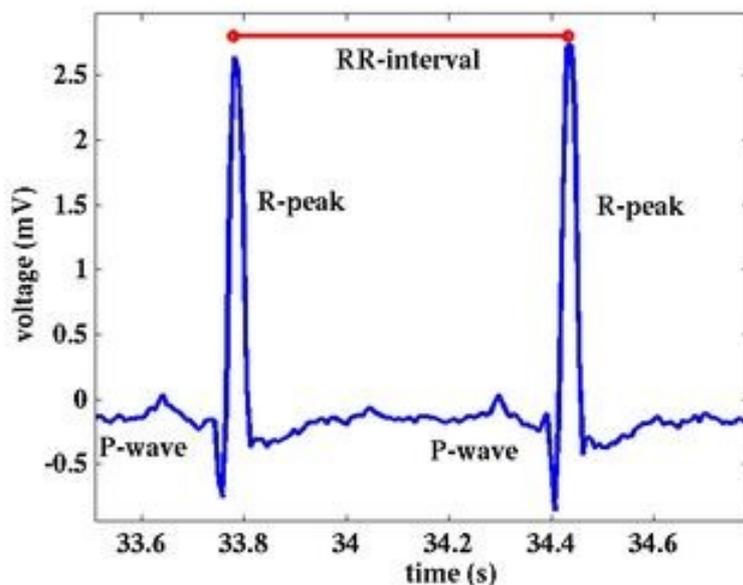
Das Zusammenspiel von Sympathikus und Parasympathikus resultiert in der HFV. In Körperruhe überwiegt die vagale Stimulation; HFV-Schwankungen beruhen dann vor allem auf Änderungen des Vagotonus.

## 1.2 Maße des Zeit-Bereiches zur Charakterisierung der Herzfrequenzvariabilität

Als Grundlage für die Berechnung verschiedener HZV-Maße dienen EKG-Aufzeichnungen. Diese Maße werden in zwei Gruppen eingeteilt: Maße aus dem Zeit-Bereich und Maße aus dem Frequenz-Bereich.

Mit der EKG-Analyse kann entweder die Herzfrequenz zu jedem Zeitpunkt der Aufzeichnung oder die Intervalllänge zwischen aufeinander folgenden, normalen RR-Zacken bestimmt werden, so dass die NN-Intervalle (normal to normal) oder die augenblickliche Herzfrequenz berechnet werden kann (Abb. 4).

Einfache Zeit-Bereichs-Maße sind z.B. Mittelwert der NN-Intervalle (mean NN-interval), Mittelwert der Herzfrequenz und der Unterschied zwischen dem längsten und dem kürzesten NN-Intervall.



**Abb. 4:** EKG mit Darstellung eines RR-Intervalles (NN-Intervall = normal to normal interval) Internet

Es lassen sich auch komplexere statistische Zeit-Bereichs-Maße ermitteln: a) direkt aus den NN-Intervallen oder der momentanen Herzfrequenz und b) aus den Unterschieden zwischen den NN-Intervallen. Diese Maße können aus der kompletten EKG-Aufzeichnung oder aus kürzeren Aufzeichnungen (einige Minuten) hergeleitet werden.

Die einfachste Variable ist die Standardabweichung der NN-Intervalle (**SDNN**). SDNN ist von der Aufzeichnungslänge abhängig, weshalb laut Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology [1996] die Aufzeichnungslängen zur Berechnung der SDNN Messwerte standardisiert sein sollten; beim Menschen werden Intervalllängen von 5 min für Kurzzeit-Messungen akzeptiert.

Pelzer et al. [1995] zeigten, dass die Intervalllänge zur Berechnung der SDNN-Werte bis auf 3 min bei gleich bleibend aussagekräftigen Werten herabgesetzt werden konnte.

SDNN-Werte dienen der allgemeinen Beurteilung der HFV [Mangin et al., 1998]. Durch Kleiger et al. [1987] wurde in einer Studie am Menschen (Multi-Center-Post-Infarction-Program; MPIP) zum ersten Mal gezeigt, dass SDNN ein unabhängiger Risikofaktor für die Sterbewahrscheinlichkeit ist. SDNN-Werte  $< 50$  ms weisen auf eine hochgradige Einschränkung der HFV hin, während SDNN-Werte zwischen 50 und 100 ms eine geringgradige Einschränkung bedeuten. SDNN-Normwerte liegen bei  $141 \pm 39$  ms [Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology, 1996]. In einer von Buccelletti et al. [2009] kürzlich veröffentlichten Meta-Analyse wurde festgestellt, dass bei Patienten nach Myokardinfarkt bei einem SDNN-Wert unter 70 ms bei einer 24-h-EKG-Aufzeichnung ein vierfach höheres Risiko besteht, in den nächsten drei Jahren zu versterben.

Die am häufigsten gebrauchten Maße, die aus den Unterschieden der NN-Intervalle berechnet werden, sind (a) **RMSSD**, die Quadratwurzel des Mittelwertes der Summe der quadrierten Differenzen zwischen benachbarten NN-Intervallen, (b) **NN50**, die Anzahl der Paare benachbarter NN-Intervalle, die mehr als 50 ms voneinander in der gesamten Aufzeichnung abweichen und (c) **pNN50**, der Prozentsatz der Intervalle mit mindestens 50 ms Abweichungen vom vorausgehenden Intervall. Bei normalem Sinusrhythmus und normaler AV-Knotenfunktion beschreibt jeder dieser Messwerte quantitativ die durch die Atmung hervorgerufene parasympathische Modulation der normalen RR-Intervalle [Kleiger et al., 2005].

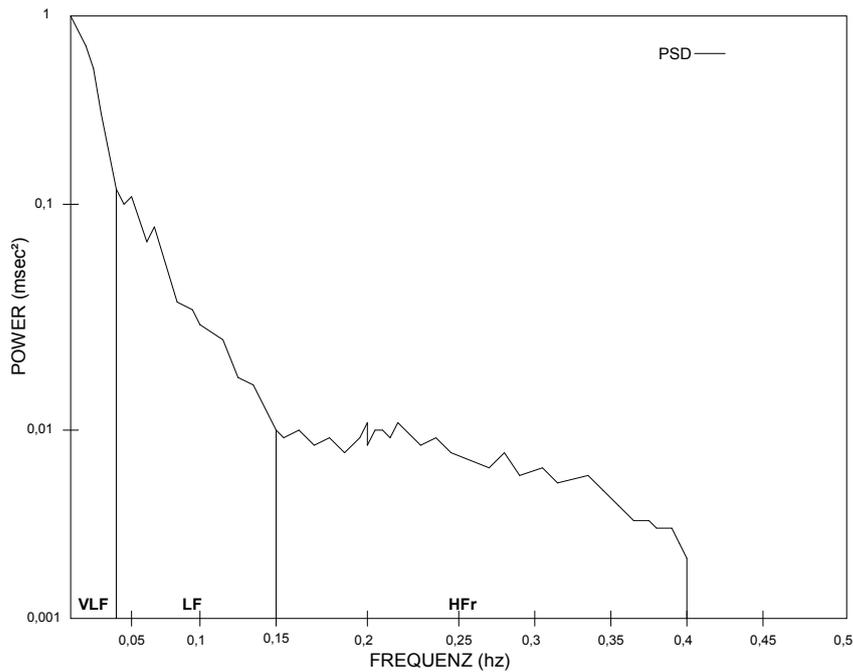
Die genannten Messwerte der Kurzzeit-Variation beurteilen sogenannte Hochfrequenz-Schwankungen der Herzfrequenz und sind dadurch hoch miteinander korreliert. Laut Pelzer et al. [1995] eignet sich beim Menschen aber nur der RMSSD-Wert für Kurzzeit-Intervallberechnungen von minimal 3 min. Die anderen Maße weisen bei kleinen Intervalllängen große Schwankungen auf. Laut Mangin et al. [1998] dient der RMSSD vor allem der Beurteilung der Kurzzeit-Komponenten der HFV und damit der parasympathischen Effekte.

### 1.3 Maße des Frequenz-Bereiches zur Charakterisierung der Herzfrequenz-variabilität

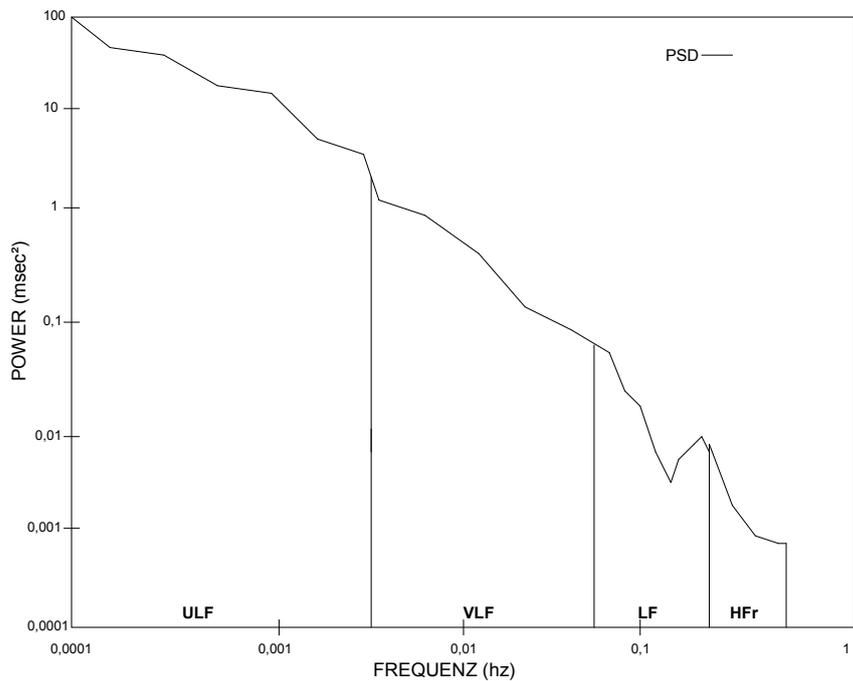
Neben den Maßen des Zeit-Bereiches kommen seit den späten 60er Jahren verschiedene Spektralmethoden für die Analyse der EKG-Aufzeichnungen und der Tachogramme zum Einsatz. Unabhängig von der Wahl der Methode ist nur auf Basis von exakter mathematischer Algorithmen eine Schätzung der wahren spektralen Leistungsdichte der Signale möglich [Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology, 1996].

Methoden zur Berechnung der Spektralen Leistungsdichte (PSD = power spectral density) werden in zwei Gruppen unterschieden: parametrische und nicht-parametrische. In den meisten Fällen liefern beide Methoden vergleichbare Resultate. Für die nicht-parametrischen Methoden spricht: (a) die Einfachheit des Algorithmus (in den meisten Fällen eine Fast Fourier Transformation; FFT) und (b) das hohe Verarbeitungstempo. Dagegen sind die Vorteile der parametrischen Methode: (a) problemlosere Spektralkomponenten, die unabhängig von vorgewählten Frequenzbereichen bestimmt werden können, (b) leichte Nachbearbeitung der Spektren mit automatischer Kalkulation der tiefen und hohen Frequenzkomponenten und einfacher Identifikation der zentralen Frequenz jeder dieser Komponenten und (c) genauere Schätzung der PSD auch bei kleinerer Stichprobe, wenn das Signal als unveränderlich angenommen wird. Der größte Nachteil der parametrischen Methode ist die Notwendigkeit, die Eignung und Komplexität des gewählten Modells nachzuweisen [Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology, 1996].

Sowohl Fast Fourier Transformation als auch Autoregressionstechniken können genutzt werden, um die zyklische Fluktuation der RR-Intervalle quantitativ zu bestimmen [Kleiger et al., 2005]. In Abbildung 5 ist die logarithmierte spektrale Leistungsdichte gegenüber der logarithmierten Frequenz bei Kurzzeit-Aufzeichnungen und in Abbildung 6 bei Langzeit-Aufzeichnungen dargestellt. Bei der Frequenz sind unterschiedliche Bereiche erkennbar. Bei beiden Aufzeichnungen gibt es einen Hochfrequenzbereich (HF<sub>r</sub>), einen Bereich mit tiefen Frequenzen (LF) und einen Bereich mit sehr tiefen Frequenzen (VLF). Bei den Langzeit-Aufzeichnungen kommt noch ein Bereich mit ultratiefen Frequenzen (ULF) hinzu.



**Abb. 5:** Spektrale Leistungsdichte (PSD) mit den dazugehörigen Frequenzbereichen bei Kurzzeit-Aufzeichnungen; VLF = very low frequency, LF = low frequency und HFr = high frequency; modifiziert nach Kleiger et al. [2005]



**Abb. 6:** Spektrale Leistungsdichte (PSD) mit den dazugehörigen Frequenzbereichen bei Langzeit-Aufzeichnungen; Die Leistungsdichte (power) und die Frequenz sind jeweils logarithmisch. ULF = ultra low frequency, VLF = very low frequency, LF = low frequency und HFr = high frequency; modifiziert nach Kleiger et al. [2005]

Generell können aus Kurzzeit- und Langzeit-Aufzeichnungen verschiedene Variablen zur Beurteilung der HFV herangezogen werden (Tab. 1 und Tab. 2). Die Frequenzgrenzen stimmen mit den Abb. 5 bzw. Abb. 6 überein.

**Tab. 1:** Übersicht der Variablen der Kurzzeit-Aufzeichnungen (meist 5 min-Intervalle)

Variablen	Einheit	Beschreibung	Frequenzbereich
total power	ms <sup>2</sup>	Varianz der NN-Intervalle über das Aufzeichnungssegment	~ ≤ 0,4 Hz
VLF	ms <sup>2</sup>	Leistung im sehr tiefen Frequenzbereich (very low frequency)	≤ 0,04 Hz
LF	ms <sup>2</sup>	Leistung im tiefen Frequenzbereich (low frequency)	0,04 – 0,15 Hz
HFr	ms <sup>2</sup>	Leistung im hohen Frequenzbereich (high frequency)	0,15 – 0,4 Hz
LF/HFr		LF (ms <sup>2</sup> ) / HFr (ms <sup>2</sup> )	

**Tab. 2:** Übersicht der Variablen der Langzeit-Aufzeichnungen (24-h)

Variablen	Einheit	Beschreibung	Frequenzbereich
total power	ms <sup>2</sup>	Varianz aller NN-Intervalle	~ ≤ 0,4 Hz
ULF	ms <sup>2</sup>	Leistung im ultra tiefen Frequenzbereich (ultra low frequency)	≤ 0,003 Hz
VLF	ms <sup>2</sup>	Leistung im sehr tiefen Frequenzbereich (very low frequency)	0,003 – 0,04 Hz
LF	ms <sup>2</sup>	Leistung im tiefen Frequenzbereich (low frequency)	0,04 – 0,15 Hz
HFr	ms <sup>2</sup>	Leistung im hohen Frequenzbereich (high frequency)	0,15 – 0,4 Hz

### 1.3.1 Spektralkomponenten der Kurzzeit-Aufzeichnungen

Es gibt drei Hauptfrequenzbereiche (VLF, LF und HFr), die aus Kurzeitaufzeichnungen von 2 – 5 min errechnet werden können (Tab. 1). Die Verteilung der Leistung und der zentralen Frequenz von LF und HFr ist nicht festgelegt, sondern weicht im Verhältnis zu den Veränderungen der autonomen Modulation der Herzperiode ab.

Die Bedeutung des VLF-Bereiches ist umstritten [Kleiger et al. 2005], hat aber mit parasympathischen Aktivitäten zu tun. Dies ließ sich dadurch nachweisen, dass dieser Anteil des Frequenzspektrums nach Atropin-Gabe verschwindet. Auch durch Gabe eines Angiotensin-Converting-Enzym-Hemmers konnte der VLF-Bereich beeinflusst werden, was darauf hinweist, dass er teilweise durch das Renin-Angiotensin System reguliert wird. Andererseits wurde der VLF-Bereich eher der Thermoregulation und der vasomotorischen Aktivität zugeschrieben [Kitney R. und Rompelman, 1980]. Dies zeigt, dass die physiologische Erklärung der VLF-Komponenten noch wenig definiert ist und noch kein spezifischer physiologischer Prozess diesen Herzperiodenänderungen zugeschrieben werden kann.

Der LF-Bereich steht sowohl für die sympathische als auch die parasympathische Aktivität (Baroreflex-Modulation) des autonomen Nervensystems. Stand oder Kopf-Hochlagerung bewirkt typischerweise einen moderaten Anstieg der spektralen Leistungsdichte im LF-Bereich und eine beachtliche Verminderung im HF-Bereich [Kleiger et al. 2005].

Der HF-Bereich wird ausschließlich der parasympathischen Aktivität des autonomen Nervensystems zugeschrieben [Mangin et al., 1998]. Ist die Leistung in diesem Frequenzbereich niedrig, dann ist auch die parasympathische Aktivität niedrig.

Ein Parameter für die Interaktion zwischen Parasympathikus und Sympathikus ist der Quotient aus LF und HF [Pagani et al, 1986; Saul et al, 1988].

### 1.3.2 Spektralkomponenten der Langzeit-Aufzeichnungen

Neben den schon genannten Frequenzbereichen kommt bei der Langzeit-Aufzeichnung noch der Frequenzbereich der ultra-low frequency (ULF) hinzu (Abb. 6, Tab. 2). Bigger et al. [1992] zeigten, dass alle vier Frequenzbereiche der Langzeit-Aufzeichnungen eine allgemeine oder arrhythmogene Mortalität voraussagen, vor allem aber der ultra-tiefe Frequenzbereich die größte Assoziation zu diesem fatalen Ausgang hat.

Ein Problem der 24-h-Aufzeichnungen besteht in der Anfälligkeit für ektope Schläge, Störeffekte und Arrhythmien, die eine genaue Beurteilung der Spektralen Leistungsdichte schwierig machen.

## 1.4 **Betablocker**

Als Goldstandard der Symptomreduktion der akuten oder chronischen Myokardischämie bei koronarer Herzkrankheit gilt seit vielen Jahren die Therapie mit Medikamenten wie  $\beta$ -Blockern,  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Blockern und Nitroglycerin. Es wird entweder die Koronarperfusion verbessert oder der myokardiale Sauerstoffverbrauch in Ruhe oder unter Belastung reduziert. Dabei ist bei den  $\beta$ -Blockern die Herzfrequenzreduktion der Hauptfaktor, der für die Reduktion des Sauerstoffverbrauches und damit der Verringerung der myokardialen Ischämie verantwortlich ist.  $\beta$ -Blocker werden bei stabiler Angina pectoris als Initialtherapie empfohlen sofern keine Kontraindikationen vorliegen [Tendera et al., 2009]. Auch bei der chronischen Herzinsuffizienz nehmen  $\beta$ -Blocker weiterhin eine zentrale Rolle ein [Sal'nikov, 2009].

Die positiven Effekte der  $\beta$ -Blocker konnten in großen Studien wie MERIT-HF (Metoprolol CR/Zok Randomized Intervention Trial in Congestive Heart Failure) und CIBIS-II (Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II) bereits vor etwa zehn Jahren gezeigt werden [CIBIS-II Investigators and Committees, 1999; MERIT-HF Study Group, 1999]. Die Bedeutung der  $\beta$ -Blocker für die Herzfrequenzreduktion wurde durch Singh [2001] hervorgehoben, der einen Zusammenhang zwischen Herzfrequenzreduktion und Senkung der kardiovaskulären Mortalität nach akutem Myokardinfarkt und bei Herzinsuffizienz herstellte.

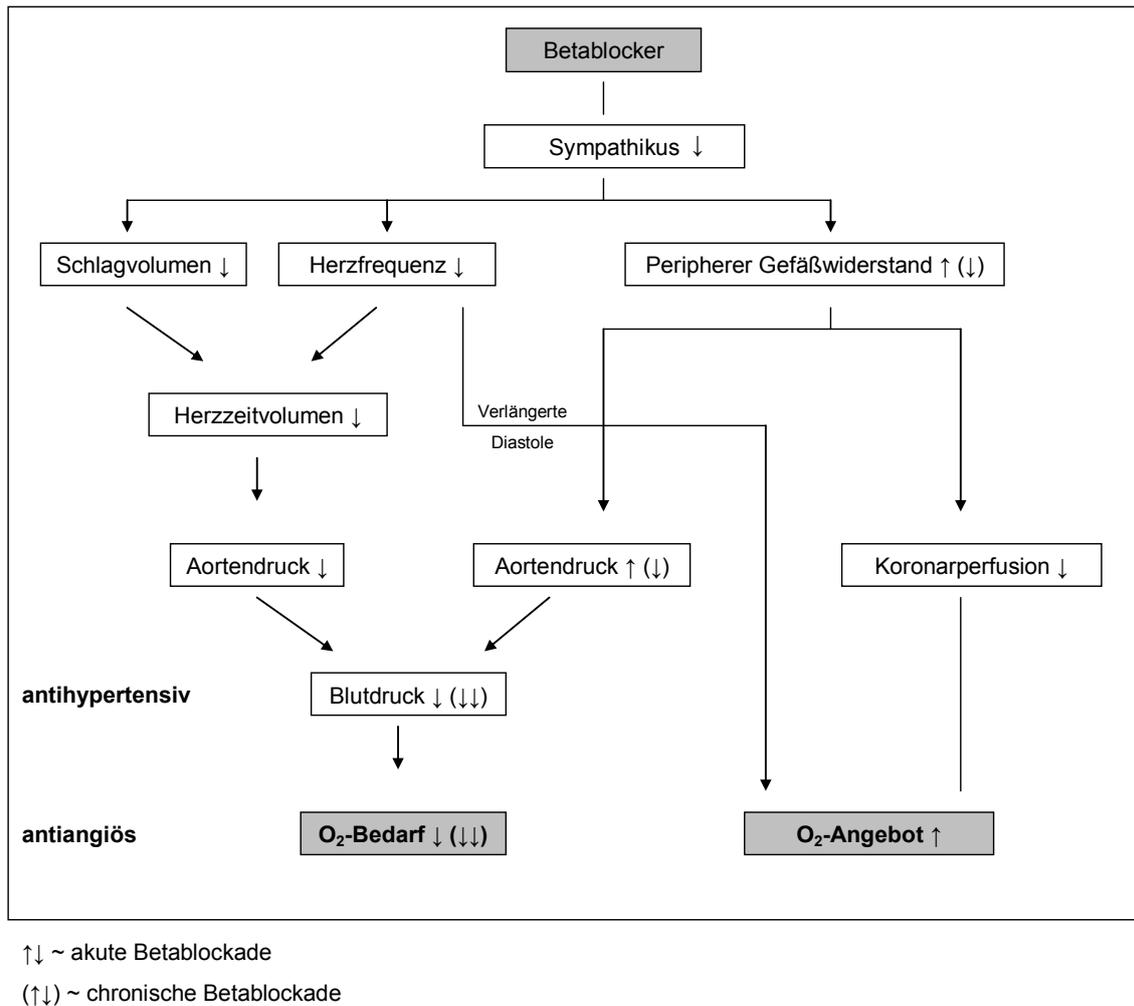
Durch eine  $\beta$ -Blockade kommt es sowohl bei Gesunden als auch bei Postmyokardinfarkt-Patienten zu einer Erhöhung der Herzfrequenzvariabilität und einem verbesserten Überleben nach Herzinfarkt [Kleiger et al., 2005]. Gilliam et al. [2007] zeigten an narkotisierten Ratten, dass  $\beta$ -Blocker alle Parameter der HFV verändern, indem sie eine Up-Regulation der parasympathischen Aktivität und eine Down-Regulation der sympathischen Aktivität hervorrufen. Neue Studien an Kaninchen [Jiang et al., 2007; Yan et al., 2007] zeigten außerdem, dass ein  $\beta$ -Blocker (= Metoprolol) in der Lage ist, die durch den gesteigerten Sympathikus hervorgerufene Überinnervation und das elektrische Remodeling an der Randzone des Myokardinfarktes zu verhindern und somit die gefährlichen ventrikulären Arrhythmien nach dem Herzinfarkt zu reduzieren.

### 1.4.1 **Wirkmechanismus**

Die Wirkung der  $\beta$ -Blocker beruht auf einer kompetitiven Hemmung endogener und exogener adrenerger Substanzen an  $\beta$ -Rezeptoren. Die Effekte der  $\beta$ -Blockade sind umso ausgeprägter, je höher der Sympathikotonus ist. An den verschiedenen  $\beta$ -Rezeptoren ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ) in den unterschiedlichen Geweben werden die folgenden Effekte ausgelöst:

- **Herz:** negativ inotrop, chronotrop, dromotrop und bathmotrop ( $\beta_1$ ),
- **Fettgewebe:** Hemmung der Lipolyse ( $\beta_1$ ),
- **Niere:** Hemmung der Reninfreisetzung ( $\beta_1$ ) → verminderte Nierenperfusion,
- **Glatte Muskulatur:** Hemmung der Dilatation → Konstriktion oder Tonuserhöhung ( $\beta_2$ ) → Bronchokonstriktion, Tonuserhöhung Darmmuskulatur und Uterus,
- **Skelettmuskel:** Hemmung der Glykogenolyse ( $\beta_2$ ),
- **Pankreas:** Hemmung der Insulinausschüttung ( $\beta_2$ ).

Die kardioselektiven  $\beta$ -Blocker nehmen bei der Behandlung von Herzerkrankungen eine zentrale Rolle ein, da sie sich durch ihre hohe Affinität zu den  $\beta_1$ -Rezeptoren und ein geringes Nebenwirkungsspektrum auszeichnen. Durch Verminderung des Schlagvolumens und der Herzfrequenz kommt es zur Verringerung des Herzzeitvolumens. Dadurch wird der Blutdruck gesenkt, und der  $O_2$ -Bedarf sinkt (Abb. 7). Außerdem führt die verringerte HF zu einer verlängerten Diastolendauer mit Verbesserung des koronaren  $O_2$ -Angebotes. Gleichzeitig kommt es aber auch bei akuter  $\beta$ -Blockade zum Anstieg des peripheren Widerstandes (durch überschießende Wirkung der  $\alpha_1$ -Rezeptoren), wodurch einerseits der Aortendruck ansteigt, so dass der blutdrucksenkende Effekt der  $\beta$ -Blocker weniger stark ausgeprägt ist. Andererseits kommt es durch  $\beta_2$ -Blockade zur Tonuserhöhung der Koronararterien und damit zur Abnahme der Koronardurchblutung, so dass die Verbesserung des  $O_2$ -Angebotes geringfügiger ausfällt. Bei chronischer  $\beta$ -Blockade normalisiert sich sowohl der periphere Gefäßwiderstand, wodurch der Blutdruck als der  $O_2$ -Bedarf sinken als auch die Koronarperfusion als Folge der verlängerten Diastolendauer, und damit wird das  $O_2$ -Angebot verbessert [Karow und Lang-Roth, 2006]. In der vorliegenden Arbeit wurde an einem tierexperimentellen Modell der Einfluss eines etablierten  $\beta$ -Blockers (= Metoprolol) auf die Herzfrequenz, den linksventrikulären Druck und Herzfrequenzvariabilität untersucht.



**Abb. 7:** Hämodynamische Effekte der  $\beta$ -Blocker; modifiziert nach Karow und Lang-Roth [2006]

### 1.5 $I_f$ -Kanalblocker

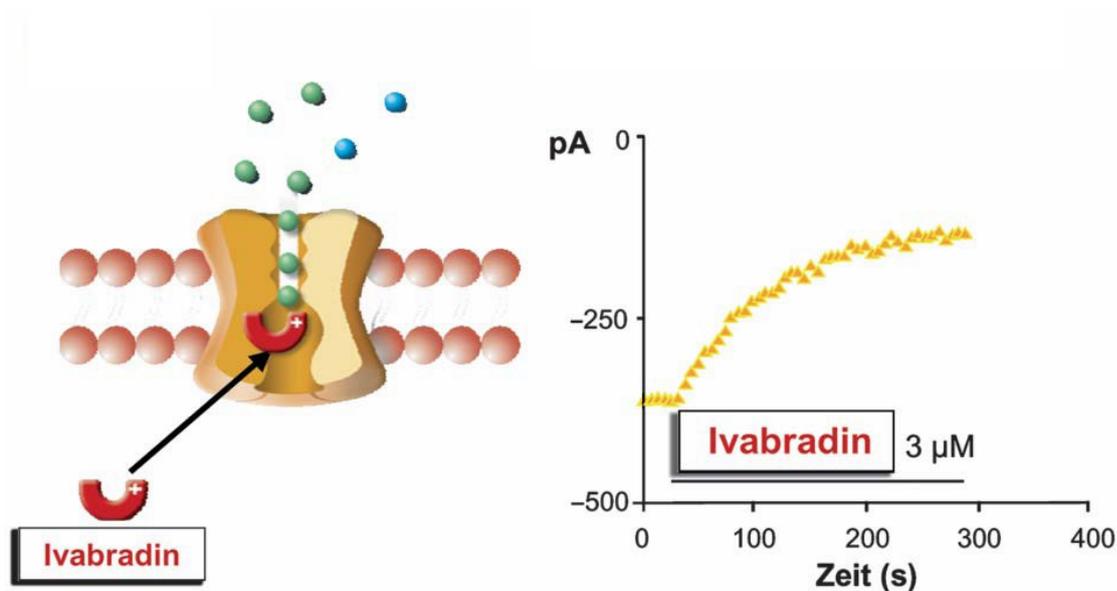
Nachdem Brown et al. [1979] erstmalig detailliert über die Eigenschaften und die Rolle des  $I_f$ -Kanals an der Erzeugung der spontanen Aktivität des Sinusknotens berichteten, wurde die Wirkung von spezifisch bradykarden Substanzen erforscht, die die Herzfrequenz über eine Blockade der  $I_f$ -Kanäle senken [Schipke et al., 2006].

Ivabradin ist die einzige verfügbare, exklusiv herzfrequenzsenkende Substanz, deren antiischämische Wirksamkeit bei Patienten mit chronisch stabiler Angina in mehreren großen klinischen Studien [Borer et al., 2003; Ruzylo et al., 2007; Tardif et al., 2005] nachgewiesen wurde [Schulz, 2006]. Daher wurde Ivabradin (Procoralan<sup>®</sup>) 2005 in Europa für die Indikation der chronisch stabilen Angina pectoris zugelassen. Eine Therapie mit Ivabradin wird bei Patienten mit stabiler Angina pectoris empfohlen, falls  $\beta$ -Blocker nicht toleriert werden oder eine Kontraindikation für diese besteht [Tardif et al., 2009].

### 1.5.1 Wirkmechanismus von Ivabradin

Ivabradin hemmt direkt und selektiv den  $I_f$ -Ionenstrom am Sinusknoten, der verantwortlich für die Schrittmacheraktivität und die physiologische Regulation der Herzfrequenz ist [Bucchi et al., 2007].

An isolierten Sinusknoten von Kaninchenherzen konnte durch DiFrancesco und Camm [2004] gezeigt werden, dass Ivabradin in einer Konzentration, in der es keine Effekte auf andere Ionenkanäle (insbesondere T- und L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanäle und verzögerte/gleichgerichtete  $K^+$ -Kanäle) ausübt, die Spontanaktivität der Schrittmacherzellen reduziert. Außerdem zeigte sich, dass die Leitfähigkeit und die Bereitschaft zur spontanen Depolarisation des Atriums, des AV-Knotens, des His-Purkinje-Systems und der Ventrikel nicht durch Ivabradin modifiziert wurden [Camm und Lau, 2003]. Die Steigung der langsamen diastolischen Depolarisation wird abgeschwächt, wohingegen das maximale diastolische Potential und der Schwellenwert, der zum AP führt, unbeeinflusst bleiben. Die Blockade des  $I_f$ -Stromes erfolgt konzentrationsabhängig von der intrazellulären Seite des Kanals (Abb. 8). Die Bindung und Entkoppelung von Ivabradin an dieser Seite ist nur im 'offenen'- Zustand des Kanals möglich und ist bei Spannungen in Richtung Depolarisation effektiver als bei Spannungen in Richtung Hyperpolarisation. Das bedeutet, dass die Blockade nutzungsabhängig ist, was die Blockaderate bei hohen Herzfrequenzen fördert [DiFrancesco und Camm, 2004; Borer und Heuzey, 2008]. Weitere Studien [Bucchi et al., 2002; DiFrancesco, 2006] zeigten, dass vor allem der elektrochemische Gradient (Richtung des Ionenstromes über den Kanal) und weniger die absolute Spannung über dem Kanal für den Umfang der Blockade des Kanals verantwortlich ist, weshalb die Blockade des Kanales auch als „Ionenstrom-abhängig“ definiert werden kann.



**Abb. 8:** Spezifische Bindung von Ivabradin am  $I_f$ -Kanal (links), Abhängigkeit des Ionenstroms (pA) von der Zeit (s) bei einer Ivabradindosierung von  $3 \mu\text{M}$  (rechts) modifiziert nach Schulz [2006].

Ivabradin blockiert in einer Konzentration von  $3 \mu\text{M}$  den  $I_f$ -Kanal signifikant. Es erreicht in höheren Konzentrationen eine Plateau-Phase, bei der der  $I_f$ -Kanal 100-%ig blockiert ist, was zu einer maximalen Herzfrequenzsenkung von 33 % führt [Mangoni et al., 2006]. Beim Menschen wird nach zweiwöchiger Behandlung mit Ivabradin eine submaximale, nach 1-monatiger Therapie die maximale Herzfrequenzreduktion erreicht [Borer und Heuzey, 2008].

### 1.5.2 Nebenwirkungen von Ivabradin

Die Tatsache, dass Ivabradin alle vier HCN-Kanal-Subtypen gleichermaßen blockiert, erklärt auch die auftretenden Nebenwirkungen an der Retina, wo vor allem  $\text{HCN}_1$ -Kanäle exprimiert werden [Stieber, 2008]. Bei der Therapie mit Ivabradin treten in geringen Fällen visuelle Nebenwirkungen im Sinne von Phosphenen auf, d.h. begrenzte, umschriebene Aufhellungen im Gesichtsfeld, verzerrtes Sehen oder eine verschwommene Sicht [Borer et al., 2003; Büter, 2006; Tardif et al., 2009]. Diese visuellen Nebenwirkungen sind mild und flüchtig, ohne Einfluss auf die täglichen Aktivitäten der Patienten, und sie sind bei Absetzen der Therapie rasch rückläufig. Weitere seltene Nebenwirkungen sind Kopfschmerzen, Schwindel, Übelkeit, periphere Ödeme, Palpitationen sowie Obstipation und Diarrhö [Tardif et al., 2005; arznei-telegramm, 2006, Ruzyllo et al., 2007]. Es kommt

im Gegensatz zur Therapie mit  $\beta$ -Blockern zu keinem Rebound-Phänomen [Borer und Heuzey, 2008], und die Therapie mit Ivabradin birgt ein geringes Risiko, extreme Bradykardien zu entwickeln [Ruzylo et al., 2007; Stieber, 2008].

Für die vorliegende Studie war nicht zu erwarten, dass Ivabradin bei den Kaninchen unerwünschte Nebenwirkungen ausübte.

### 1.6 Ziel der Studie

Das Ziel der vorliegenden Studie war, bei narkotisierten Kaninchen nach experimentellem Myokardinfarkt die möglichen Vorteile von Ivabradin im Vergleich zu Metoprolol anhand von hämodynamischen Werten (Herzfrequenz, maximaler linksventrikulärer Druck und Veränderungen der Herzfrequenzvariabilität (SDNN-Werte und RMSSD-Werte) nachzuweisen. Dabei sollten die folgenden Fragen beantwortet werden:

- Führt die Gabe von Metoprolol oder Ivabradin zu einer dauerhaften Verminderung der Herzfrequenz?
- Zeigen sich die therapeutischen Effekte in der Veränderung der linksventrikulären systolischen Funktion?
- Wird die Herzfrequenzvariabilität nach Gabe von Metoprolol oder nach Gabe von Ivabradin verbessert?



## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen**

Die Versuche wurden an 90 adulten, männlichen New-Zealand-White Kaninchen im Zeitraum von 2002 – 2004 durchgeführt. Die Kaninchen hatten ein Körpergewicht von 1085 bis 4100 Gramm, und ihr Alter lag zwischen 12 und 22 Wochen. Alle Tiere stammten aus einer pathogenfreien Versuchszucht und wurden über die Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bezogen. Die Experimente wurden gemäß § 8a des Deutschen Tierschutzgesetzes vom 25. Mai 1998 der Regierung von Nordrhein-Westfalen durchgeführt.

#### **2.1.1 Studienablauf**

Der Studienablauf umfasste die folgenden drei Phasen (s. auch Abb. 11):

##### **Phase A:**

Bei den Versuchstieren wurde in Narkose eine laterale Thorakotomie durchgeführt. Durch Unterbindung des Ramus interventricularis anterior der A. coronaria sinistra wurde eine regionale Myokardischämie gesetzt. Je nach Gruppe erhielten die Tiere unterschiedliche Medikamente. Der Thorax wurde verschlossen und die Tiere in der Tierversuchsanlage Düsseldorf artgerecht gepflegt.

##### **Phase B:**

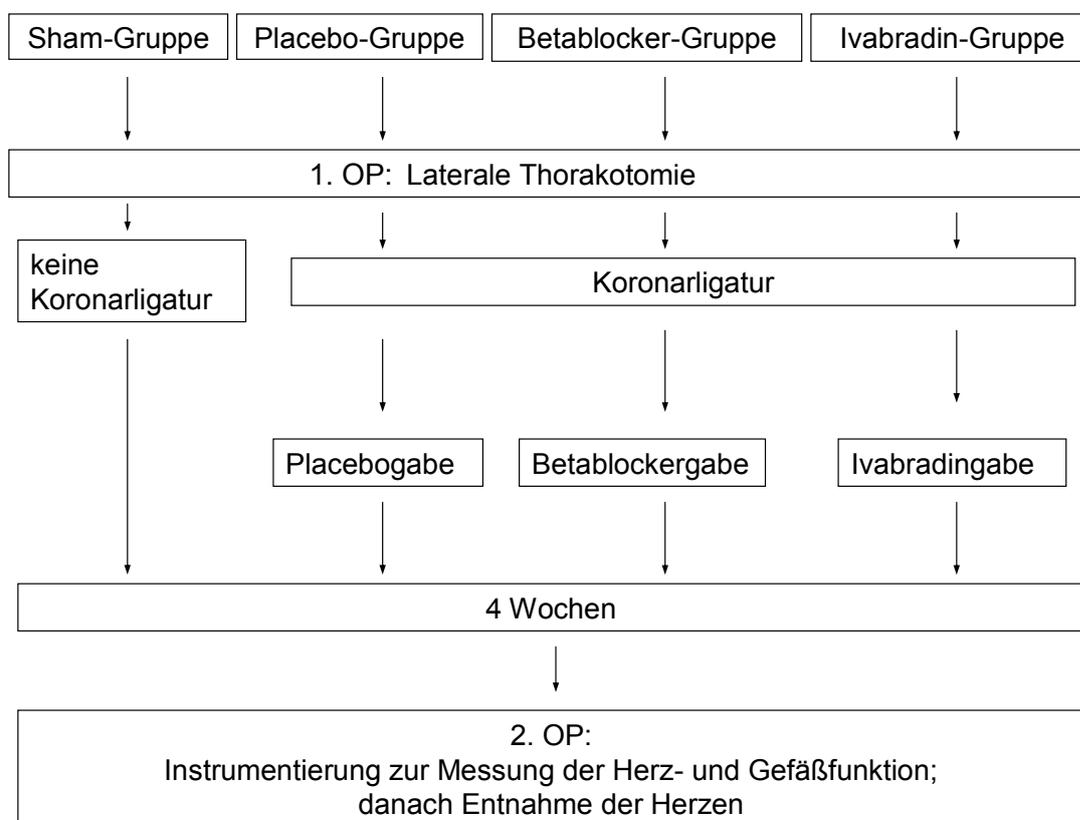
Diese Versuchsphase umfasste die ersten vier postinterventionellen Wochen. Medikamente oder Placebo wurden den Tieren täglich von den Tierpflegern der Versuchsanlage Düsseldorf verabreicht.

##### **Phase C:**

Am 28. postinterventionellen Tag wurde das Versuchstier nach Narkotisierung sternotomiert, und es erfolgte eine Perikardiotomie.

### 2.1.2 Versuchstiergruppen

Es wurden vier Versuchsgruppen gebildet (Abb. 9).



**Abb. 9:** Gruppeneinteilung und Versuchsablauf

Bei den Tieren der Sham-Gruppe (n=24) wurde weder ein Koronargefäß ligiert noch ein postinterventionelles Medikament verabreicht. Die Pla-Gruppe (n=21) erhielt nach der Koronarligatur eine Placebosubstanz (NaCl 0,9 %). Eine dritte Gruppe (n=17) wurde mit dem  $\beta$ -Blocker Metoprolol behandelt. Die vierte Gruppe (n= 28) erhielt die spezifisch bradykarde Substanz Ivabradin. Nach der vierwöchigen 'Therapiephase' und nach der zweiten Operation war die Anzahl der Tiere, von denen Daten erhoben werden konnten, in allen vier Gruppen deutlich reduziert (Tab. 3).

**Tab. 3:** Übersicht über die Anzahl der Versuchstiere (EKG- und computergestützte Daten), je nach Untersuchung.

	Sham	Placebo	Metoprolol	Ivabradin
1. OP	24	21	17	28
2. OP	10	11	10	18

Da bei dieser retrospektiven Studie ausschließlich computergestützt erfasste Daten ausgewertet wurden, verändert sich die Anzahl der Versuchstiere von Tab. 3 wie folgt (Tab. 4):

**Tab. 4:** Übersicht über die Anzahl der Tiere mit verfügbaren, computergestützten Daten.

	Sham	Placebo	Metoprolol	Ivabradin
1. OP	10	11	5	15
2. OP	9	7	9	16

## 2.2 Erste Operation zur Koronarligatur

### 2.2.1 Narkose und Einleitung

Die Narkose der Kaninchen erfolgte mit einer Kombination aus 10 % Ketaminhydrochlorid (25 mg/kg, i.m. Ketavet<sup>®</sup>, Pharmacia & Upjohn GmbH, USA) und 2 % Xylazinhydrochlorid (25 mg/kg Rompun<sup>®</sup>, Bayer Vital GmbH & Co., D). Zur i.v. Applikation weiterer Arzneimittel wurde ein Zugang zu einer Ohrvene geschaffen, und die Tiere wurden intubiert (Endotrachealkanüle von 3,2 – 3,6 mm Innendurchmesser, Laboratoires pharmaceutiques VYGON). Während der Operation wurden die Kaninchen mit dem Narkosegas Enflurane (Ethrane<sup>®</sup>) und einem Gasgemisch aus Sauerstoff (O<sub>2</sub>) und Lachgas (N<sub>2</sub>O) mit einem Kleintierrespirator (Modell 7025, Ugo Basile Comercio, I) kontrolliert beatmet. Ein intraoperativer Flüssigkeitsverlust wurde mit einer 0,9 %-igen NaCl-Infusion ausgeglichen, der zuvor 2 ml Lidocain (Xylocain<sup>®</sup>) (1 %) zugesetzt wurden, um einem Kammerflimmern vorzubeugen. Als Antibiotikaprophylaxe zum Schutz vor möglichen Infektionen erhielten die Tiere einmalig Cephazolin (Elzogram<sup>®</sup>; 50 mg/kg i.v.).

### 2.2.2 In-situ-Messungen

Während des gesamten operativen Eingriffes wurde die Körpertemperatur überwacht und mit Hilfe eines Heizkissens bei ca. 38 °C konstant gehalten. Zur kontinuierlichen Herzfrequenzüberwachung wurde ein EKG abgeleitet.

Nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe wurde eine laterale Thorakotomie im vierten Interkostalraum links durchgeführt. Um das Herzzeitvolumen zu messen, wurde nach Perikarderöffnung ein Flussmesskopf (4SB256, Transonic Systems, USA) um die A. pulmonalis platziert und mit einem Flussmessgerät (T206 2-channel, Transonic Systems, USA) verbunden. Ein Nadeltipkatheter (3F, Millar Instruments, USA) wurde über die Herzspitze in den linken Ventrikel eingeführt, um den intraventrikulären Druck zu messen. Zur Blutgasanalyse wurden den Kaninchen 7 ml Blut aus dem linken Ventrikel

entnommen. Nach der Instrumentierung folgte eine 30-min Stabilisierungsphase, um eine Erholung von operationsbedingten Irritationen (z.B. Tachykardie, Arrhythmien) zu ermöglichen.

### 2.2.3 Setzen der Myokardischämie

Die Kaninchen wurden randomisiert einer der vier Versuchsgruppen zugeordnet. Bei der Placebo-, der  $\beta$ -Blocker- und der Ivabradin-Gruppe wurde jeweils eine Myokardischämie gesetzt:

Der Hauptast der linken Koronararterie wurde auf der Hälfte zwischen Abgang und Herzspitze ligiert. Bei Auftreten von Kammerflimmern wurde Lidocain (Xylocain<sup>®</sup>; 1 mg/kg als Bolus) gegeben. Bei Erfolglosigkeit wurde mit 2,0 J epikardial defibrilliert und eine Herzdruckmassage durchgeführt. Eine erneute Blutentnahme (7 ml) wurde vorgenommen, wenn die Kaninchen hämodynamisch und elektrisch stabil waren. Danach wurde die Lunge gebläht und der Thorax schichtweise verschlossen.

Im Anschluss an die Operation wurde den Tieren je nach Gruppenzuteilung entweder physiologische Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %), ein  $\beta$ -Blocker (Metoprolol 0,25 mg/kg) oder Ivabradin (0,25 mg/kg) i.v. verabreicht. Die Tiere erhielten zur antibiotischen Prophylaxe 0,3 ml Amoxicillin (Amoxyphen<sup>®</sup>) und als Analgetikum 0,3 ml Piritramid (Dipidor<sup>®</sup>) s.c..

Während der folgenden vier Wochen erhielten die Kaninchen je nach Gruppenzuteilung Placebo oder die jeweilige Substanz (0,25 mg/kg) einmal täglich in NaCl gelöst oral.

### 2.2.4 Blutgasanalyse

Es wurden regelmäßige Messungen des pH-Wertes, des  $pO_2$  und  $pCO_2$  vorgenommen (ABL 505 Radiometer, Kopenhagen, DK). Die Werte wurden nach Narkoseeinleitung und nach Medikamentengabe gemessen und bei Bedarf korrigiert.

## 2.3 Zweite Operation vier Wochen nach Koronarligatur

Zur Kontrolle der in-situ-Messungen (Aortenfluss, intraventrikulärer Druck) erfolgte vier Wochen nach der ersten Operation eine erneute Eröffnung des Thorax mit erneuter Messung und anschließender Entnahme der Herzen zu weiteren Versuchszwecken.

### 2.3.1 Narkose und Einleitung

Die Tiere wurden erneut mit 10 % Ketaminhydrochlorid (30 mg/kg; Ketavet<sup>®</sup>, Pharmacia & Upjohn GmbH, USA) und 2 % Xylazinhydrochlorid (5 mg/kg; Rompun<sup>®</sup>, Bayer Vital GmbH & CoKG, D) i.m. narkotisiert. Anschließend wurde eine Venenverweilkanüle in der Ohrtrandvene angebracht. Nach Überprüfung der Narkosetiefe wurde eine vollständige Schmerzfreiheit der Tiere erreicht, indem bei Bedarf fraktioniert 0,2 – 0,6 mg 0,1 % Flunitrazepan (i.v.; Rohypnol<sup>®</sup>, Hoffmann-La Roche AG, D) appliziert wurde. Die Tiere wurden daraufhin tracheotomiert (5. – 6. Trachealknorpel) und intubiert. Eine Relaxation der Muskulatur wurde mit 1,0 mg 0,2 % Pancuroniumbromid (i.v.; Pancuronium<sup>®</sup>, Organon Technika Medizinische Produkte GmbH, D) erreicht. Im Anschluss wurden die Tiere mit einer Atemfrequenz von 30-35 min<sup>-1</sup> [Altman et al., 1972-1974] und einem Atemzugvolumen von 20-30 ml [Altman et al., 1972-1974] eines Raumluft-Sauerstoff-Gemisches kontrolliert beatmet.

### 2.3.2 Chirurgische Eingriffe und in-situ-Messungen

Die Eröffnung des Thorax erfolgte durch eine mediane Sternotomie. Nach Entfernung des Thymusgewebes wurde das Perikard eröffnet. Zum Zeitpunkt der Perikardiotomie erhielten die Tiere 2.500 I.E. Heparin-Natrium (i.v.; Liquemin<sup>®</sup> N25000, Hoffmann-La Roche AG, D), um einer Thrombenbildung vorzubeugen.

Die rechte V. jugularis und die linke A. carotis wurden für venöse bzw. arterielle Messungen kanüliert. Der Aortenfluss wurde mittels eines um die Aorta ascendens platzierten Flussmesskopfes (4SB256, Transonic Systems, USA) gemessen, der mit einem Flussmessgerät (T206 2-channel, Transonic Systems, USA) verbunden war. Anschließend wurde über die Herzspitze ein Nadeltipkatheter (3F, Millar, Instruments, USA) in den linken Ventrikel eingeführt und der intraventrikuläre Druck gemessen.

Auch nach diesem Eingriff folgte eine 30-min Stabilisierungsphase. Zur kontinuierlichen Herzfrequenzüberwachung wurde ein EKG abgeleitet. Die hämodynamischen Werte wurden in der anschließenden 15-min Kontrollphase erfasst.

### 2.3.3 Blutgasanalyse

Es wurden erneut der pH-Wert, der pO<sub>2</sub> und pCO<sub>2</sub> gemessen (ABL 505 Radiometer, Kopenhagen, DK). Die Werte wurden bei Bedarf korrigiert.

## 2.4 Datenregistrierung

Die Herzfrequenz-Registrierung erfolgte zunächst mit einem EKG-Schreiber (Schiller Medizintechnik GmbH, Cardiovit AT-1, Essen, D). Im späteren Versuchsverlauf erfolgte die Registrierung computergestützt mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Datenregistrierungs- und -analyse-Programmes (PowerLab; ADInstruments, Castle Hill, AUS). Die Daten der folgenden vier Messzeitpunkte wurden zur weiteren Auswertung in allen vier Versuchsgruppen erhoben (Tab. 5):

**Tab. 5:** vier Messzeitpunkte der Datenauswertung

Messzeitpunkte	Bezeichnung
Kontrollzeitpunkt, vor Intervention	T <sub>1</sub> B <sub>0</sub>
nach Ligatur oder Sham-Manöver	T <sub>1</sub> B <sub>1</sub>
nach erster Medikamentengabe	T <sub>1</sub> B <sub>2</sub>
2. Versuch, nach vier Wochen Therapie	T <sub>2</sub> B <sub>3</sub>

### 2.4.1 Hämodynamische Größen

Die Dauer der Datenregistrierung führte zu einer Kurzzeitanalyse der Herzfrequenzvariabilität (HFV). Sowohl der linksventrikuläre Druck (LVP) als auch das EKG dienten als Berechnungsgrundlage für die Parameter der HFV, wobei grundsätzlich vom Drucksignal ausgegangen wurde. War das Signal nicht verfügbar, dann wurde auf das EKG zurückgegriffen. Insbesondere bei HFV-Berechnungen mittels EKG war eine manuelle Kontrolle nötig. Wegen seiner sicheren Erkennbarkeit wurde die Länge des 'RR-Intervalles' typischerweise aus den Abständen der LVP-Maxima bestimmt.

Je nach vorhandener Aufzeichnungslänge der Daten wurde nach einer Stabilisierungsphase (stabile Aufzeichnungen  $\geq 30$  s) ein Zeitintervall von 2 min bestimmt, das als Berechnungsgrundlage für die HFV-Parameter diente. Diese Entscheidung basierte auf der Grundlage, dass bei einer Herzfrequenz von 80 Schlägen/min zur sicheren Erfassung der Kurzzeit-Herzfrequenz-Variabilität eine minimale Intervall-Länge von 3 min benötigt wird (= 240 Schläge) [Pelzer et al., 1995]. Bei Kaninchen kann von einem 2-min-Intervall ausgegangen werden, da diese Herzfrequenzen von 220 – 325 Schlägen/min haben (= 440 – 650 Schläge als Berechnungsgrundlage) [Schall, 2005].

Die Grenzen für die Erfassung von ektopten Schlägen, Artefakten und normalen Schlägen sind in Tab. 6 beschrieben. Die Artefaktkontrolle erfolgte interaktiv.

**Tab. 6:** Grenzen zur Erfassung von ektope Schlägen, Artefakten und normalen Schlägen (ms) in Bezug zur Herzfrequenz (/min)

Interpretation	Dauer		Herzfrequenz (HF)
Artefakte	< 5 ms	↔	> 12.000 Schläge /min
Ektop	5 – 150 ms	↔	von 400 – 12.000 Schläge /min
Normal	150 – 545,5 ms	↔	von 110 – 400 Schläge /min
Ektop	545,5 – 1000 ms	↔	von 60 – 110 Schläge /min
Artefakte	> 1000 ms	↔	< 60 Schläge /min

#### 2.4.2 Parameter der Herzfrequenzvariabilität

Die Auswahl der HFV-Parameter erfolgte aufgrund der Empfehlung der Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology [1996]. Sie beschränkte sich auf die durchschnittliche Herzfrequenz (dsHF), die Standardabweichung aller NN-Intervalle (normal-to-normal Intervalle; SDNN) und die Quadratwurzel des Mittelwertes der Summe der quadrierten Differenzen zwischen benachbarten NN-Intervallen (RMSSD) (Tab. 7). Diese drei Größen gehören zu den Maßen des Zeit-Bereiches.

**Tab. 7:** Errechnete Maße der Herzfrequenzvariabilität

Parameter	Einheit
dsHF	/min
SDNN	ms
RMSSD	. / .

Für die Berechnung der dsHF-, SDNN- und RMSSD-Werte dienten die 2 min-Intervalle als Grundlage. Da bei der Sham-Gruppe zum Zeitpunkt des Sham-Manövers meist keine 2 min-Intervalle vorlagen, wurde hier die dsHF folgendermaßen berechnet: Grundlage waren die 5 Intervalllängen zwischen dem 50. bis zum 55. detektierten Schlag des LVP-Signales. Bei dem Vergleich der Daten der Sham-Gruppe zum Zeitpunkt 'Kontrolle, vor Intervention' (=  $T_1B_0$ ) und Zeitpunkt 'nach Sham-Manöver' (=  $T_1B_1$ ) zeigte sich, dass die hämodynamischen Werte bei einem Tier zu diesen beiden Zeitpunkten nahezu identisch waren. Daher wurden die  $LVP_{max}$ -, dsHF-, SDNN- und RMSSD-Werte zum Zeitpunkt  $T_1B_0$  für den Zeitpunkt 'Sham-Manöver' (=  $T_1B_1$ ) übernommen.

## 2.5 Berechnungen und Statistik

Die Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Um Ausreißer adäquat berücksichtigen zu können, wurden eine Median- und eine Perzentilenanalyse durchgeführt. Die statistische Aufarbeitung erfolgte mit dem Programm SPSS 17.0 für Windows (SPSS Inc. Headquarters, USA). Nach deskriptiver Auswertung der Daten und Prüfung auf Normalverteilung durch einen Kolmogorov-Smirnov-Test [Sachs und Hedderich, 2006] mit Signifikanzkorrektur nach Lillifors wurden die Daten ( $LVP_{max}$  und dsHF, SDNN und RMSSD) der verschiedenen Gruppen (Sham-, Placebo-,  $\beta$ -Blocker- und Ivabradin-Gruppe) logarithmiert, um eine Normalverteilung der Daten zu erhalten. Nach erneuter Testung auf Normalverteilung wurden die Daten ( $LVP_{max}$ , dsHF, logSDNN, logRMSSD) zum Kontrollzeitpunkt ( $T_1B_0$ ) mittels eines Kruskal-Wallis-Tests auf Homogenität getestet. Anschließend erfolgte die Analyse der Daten mittels eines Mann-Whitney-U-Tests oder mit dem Kruskal-Wallis-Test. Hierbei wurden die Veränderungen in den verschiedenen Gruppen zu den Zeitpunkten Ligatur/Sham-Manöver ( $T_1B_1$ ), erste Medikamentengabe ( $T_1B_2$ ) und zweiter Versuch ( $T_2B_3$ ) in Bezug zum Kontrollzeitpunkt ( $T_1B_0$ ) gesetzt. Damit ergaben sich die drei Differenzen  $T_1B_1 - T_1B_0$ ,  $T_1B_2 - T_1B_0$  und  $T_2B_3 - T_1B_0$ .

Die weitere statistische Auswertung der Daten erfolgte über das Programm R (Version 2.9.0; 2009, The R Foundation for Statistical Computing, AT).

Es wurde ein Mixed-effects-Modell zur Datenanalyse angewendet. Hierbei konnten nur die Daten dsHF und logSDNN ausgewertet werden, da die Voraussetzungen (Normalverteilung der Residuen) für die  $LVP_{max}$ -Werte und die logRMSSD-Werte nicht gegeben waren. Die Gruppen wurden sowohl zu drei Messzeitpunkten a) 1. Versuch ( $T_1$ ) nach Ligatur oder Sham-Manöver, b) 1. Versuch ( $T_1$ ) nach erster Medikamentengabe, c) 2. Versuch ( $T_2$ ) (Tab. 8) als auch gruppenintern über die Zeit analysiert (innerhalb einer Gruppe zu den verschiedenen Zeitpunkten  $B_1$  zu  $B_2$  zu  $B_3$ ).

**Tab. 8:** Auswertung (dsHF und logSDNN-Werte) der Placebo-, Sham-,  $\beta$ -Blocker- und Ivabradin-Gruppe miteinander zu den folgenden Zeitpunkten:

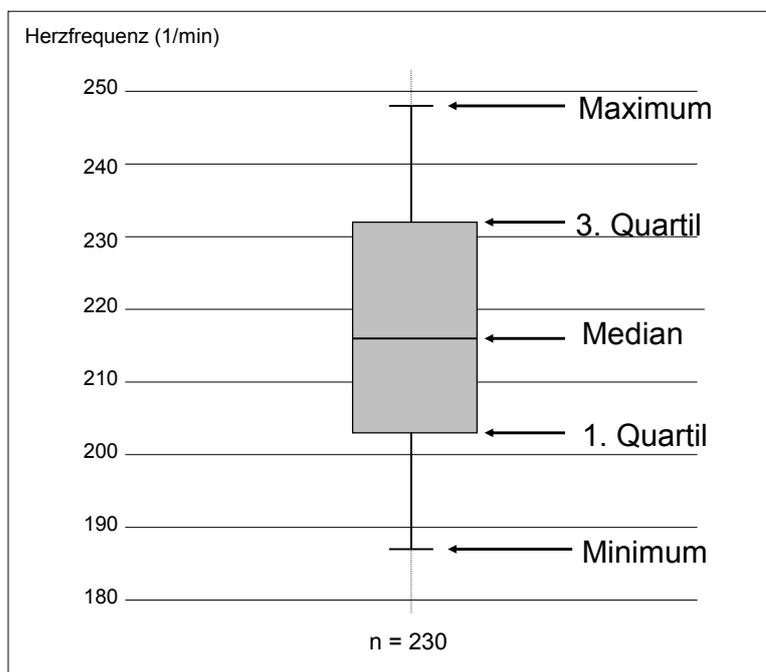
a)	$T_1$	$B_1$ : nach Ligatur oder Sham-Manöver
b)	$T_1$	$B_2$ : nach erster Medikamentengabe
c)	$T_2$	$B_3$ : 2. Versuch

Zur besseren Übersicht wurden die Daten sinnvoll gekürzt (2 oder 0 Dezimalstellen). Die Ergebnisse werden auf einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  berichtet.

### 2.5.1 Boxplot

Der Boxplot (= Kastengrafik) ist ein Diagramm zur graphischen Darstellung der Verteilung statistischer Daten. Er fasst dabei verschiedene Streuungs- und Lagemaße zusammen. Es werden der Median, das erste und dritte Quartil (25. und 75. Perzentile) sowie der Minimal- und Maximalwert eines bestimmten Parameters dargestellt, 50 % der Werte einer Verteilung liegen innerhalb der Box (Interquartilbereich). Ausreißer sind mit einem Punkt, extreme Ausreißer mit einem Sternchen markiert (Abb. 10).

Boxplots werden besonders für den Vergleich von Beobachtungsreihen verwendet, um Lage- und Streuungsunterschiede darzustellen und diese Beobachtungsreihen hinsichtlich Normalverteilung zu beurteilen.



**Abb. 10:** Beispiel für einen Boxplot

### 2.5.2 Mann-Whitney-U-Test und Kruskal-Wallis-Test

Beim Mann-Whitney-U-Test und beim Kruskal-Wallis-Test handelt es sich um das nicht parametrische Pendant zur einfaktoriellen Varianzanalyse; es werden keine normalverteilten Grundgesamtheiten vorausgesetzt. Der Mann-Whitney-U-Test geht dabei von zwei unabhängigen Stichproben, der Kruskal-Wallis-Test von mehreren unabhängigen Stichproben aus. Es wird verglichen, ob sich verschiedene unabhängige Stichproben hinsichtlich einer ordinalskalierten Variablen auf Basis von Rangplatzsummen unterscheiden. Bei einem  $p < 0,05$  wird die Nullhypothese  $H_0$  – es besteht zwischen den Gruppen kein Unterschied – verworfen und die Alternativhypothese  $H_1$  – mindestens zwei Gruppen sind ungleich – angenommen.

### 2.5.3 Mixed-effects-Modell

Ein Mixed-effects-Modell stellt eine Erweiterung linearer Modelle dar, deren Voraussetzung unabhängige Stichproben sind. Mixed-effects-Modelle können abhängige Stichproben analysieren und haben eine deutlich bessere Teststärke als der Mann-Whitney-U- oder der Kruskal-Wallis-Test. Es wird versucht, ein möglichst optimales Modell aufzustellen, das sowohl abhängige Variablen (dsHF und logSDNN) als auch mehrere unabhängige Variablen (verschiedene Zeitpunkte und Therapiegruppen) sowie einen allgemeinen Fehler und einen individuellen Fehler einschließt. Zwischen der abhängigen und den unabhängigen Variablen wird von einem Wirkungszusammenhang ausgegangen. Es wurden zwei Modelle (Modell 1 und Modell 2) aufgestellt, die miteinander verglichen wurden. Die Prüfung der Ergebnisse auf statistische Signifikanz erfolgte mit dem F-Test (ANOVA) und anhand der marginalen t-Tests.

Zur weiteren Optimierung des Modelles wurde eine Rückwärts-Selektion (Modell 3) angewendet, bei der alle nicht relevanten Variablen schrittweise entfernt werden, so dass nur noch die Variablen erhalten blieben, die signifikant zum Modell beitragen. Das AIC (=Akaike information criterion) (möglichst klein) dient dabei ebenso wie die logLikelihood (möglichst groß) als Gütekriterium.

Die verschiedenen Modelle wurden wie folgt aufgestellt:

Modell 1:

$$y = a_1 + a_2 \cdot t_2 + a_3 \cdot t_3 + a_4 \cdot t_4 + b_i + \varepsilon$$

y = abhängige Variable, dsHF oder logSDNN

a<sub>1</sub> = Modellkonstante

a<sub>2</sub> = Koeffizient der unabhängigen Variablen t<sub>2</sub>

a<sub>3</sub> = Koeffizient der unabhängigen Variablen t<sub>3</sub>

a<sub>4</sub> = Koeffizient der unabhängigen Variablen t<sub>4</sub>

t<sub>2</sub> = Zeitpunkt Sham-Manöver / Ligatur (T<sub>1</sub>B<sub>1</sub>) aller Versuchsgruppen

t<sub>3</sub> = Zeitpunkt nach einmaliger Therapiegabe (T<sub>1</sub>B<sub>2</sub>) aller Versuchsgruppen

t<sub>4</sub> = Zeitpunkt 2. Versuch nach vier Wochen Therapie (T<sub>2</sub>B<sub>3</sub>) aller Versuchsgruppen

b<sub>i</sub> = individueller Fehler der einzelnen Tiere

ε = Restfehler

Modell 2:

$$y = a_1 + a_2 \cdot t_2 + a_3 \cdot t_3 + a_4 \cdot t_4 + a_5 \cdot (t_2:\text{Sham}) + a_6 \cdot (t_3:\text{lva}) + a_7 \cdot (t_3:\text{Beta}) + a_8 \cdot (t_4:\text{lva}) + a_9 \cdot (t_4:\text{Beta}) + a_{10} \cdot (t_4:\text{Plac}) + b_i + \varepsilon$$

y = abhängige Variable, dsHF bzw. logSDNN

a<sub>1</sub>= Modellkonstante

a<sub>2</sub>= Koeffizient der unabhängigen Variablen t<sub>2</sub>

a<sub>3</sub>= Koeffizient der unabhängigen Variablen t<sub>3</sub>

a<sub>4</sub>= Koeffizient der unabhängigen Variablen t<sub>4</sub>

a<sub>5</sub> = Koeffizient der unabhängigen Variablen (t<sub>2</sub>:Sham)

a<sub>6</sub>= Koeffizient der unabhängigen Variablen (t<sub>3</sub>:lva)

a<sub>7</sub>= Koeffizient der unabhängigen Variablen (t<sub>3</sub>:Beta)

a<sub>8</sub>= Koeffizient der unabhängigen Variablen (t<sub>4</sub>:lva)

a<sub>9</sub>= Koeffizient der unabhängigen Variablen (t<sub>4</sub>:Beta)

a<sub>10</sub>= Koeffizient der unabhängigen Variablen (t<sub>4</sub>:Plac)

t<sub>2</sub> = Zeitpunkt Sham-Manöver / Ligatur (T<sub>1</sub>B<sub>1</sub>) aller Versuchsgruppen

t<sub>3</sub> = Zeitpunkt nach einmaliger Therapiegabe (T<sub>1</sub>B<sub>2</sub>) aller Versuchsgruppen

t<sub>4</sub> = Zeitpunkt 2. Versuch nach vier Wochen Therapie (T<sub>2</sub>B<sub>3</sub>) aller Versuchsgruppen

(t<sub>2</sub>:Sham) = Zeitpunkt Sham-Manöver (T<sub>1</sub>B<sub>1</sub>) der Sham-Gruppe

(t<sub>3</sub>:lva) = Zeitpunkt der ersten Medikamentengabe (T<sub>1</sub>B<sub>2</sub>) der lva-Gruppe

(t<sub>3</sub>:Beta) = Zeitpunkt der ersten Medikamentengabe (T<sub>1</sub>B<sub>2</sub>) der Beta-Gruppe

(t<sub>4</sub>:lva) = Zeitpunkt 2. Versuch nach vier Wochen Therapie (T<sub>2</sub>B<sub>3</sub>) der lva-Gruppe

(t<sub>4</sub>:Beta) = Zeitpunkt 2. Versuch nach vier Wochen Therapie (T<sub>2</sub>B<sub>3</sub>) der Beta-Gruppe

(t<sub>4</sub>:Plac) = Zeitpunkt 2. Versuch nach vier Wochen Therapie (T<sub>2</sub>B<sub>3</sub>) der Pla-Gruppe

b<sub>i</sub> = individueller Fehler der einzelnen Tiere

ε = Restfehler

Beispiel für Modell 3 anhand der Variablen (dsHF):

$$\text{dsHF} = a_1 + a_2 \cdot t_2 + a_3 \cdot t_3 + a_4 \cdot t_4 + a_5 \cdot (t_2:\text{Sham}) + a_6 \cdot (t_3:\text{lva}) + a_{10} \cdot (t_4:\text{Plac}).$$

a<sub>1</sub>= Modellkonstante

a<sub>2</sub>= Koeffizient der unabhängigen Variablen t<sub>2</sub>

a<sub>3</sub>= Koeffizient der unabhängigen Variablen t<sub>3</sub>

a<sub>4</sub>= Koeffizient der unabhängigen Variablen t<sub>4</sub>

$a_5$  = Koeffizient der unabhängigen Variablen ( $t_2$ :Sham)

$a_6$  = Koeffizient der unabhängigen Variablen ( $t_3$ :Iva)

$a_{10}$  = Koeffizient der unabhängigen Variablen ( $t_4$ :Plac)

$t_2$  = Zeitpunkt Sham-Manöver / Ligatur ( $T_1B_1$ ) aller Versuchsgruppen

$t_3$  = Zeitpunkt nach einmaliger Therapiegabe ( $T_1B_2$ ) aller Versuchsgruppen

$t_4$  = Zeitpunkt 2. Versuch nach vier Wochen Therapie ( $T_2B_3$ ) aller Versuchsgruppen

( $t_2$ :Sham) = Zeitpunkt Sham-Manöver ( $T_1B_1$ ) der Sham-Gruppe

( $t_3$ :Iva) = Zeitpunkt der ersten Medikamentengabe ( $T_1B_2$ ) der Iva-Gruppe

( $t_4$ :Plac) = Zeitpunkt 2. Versuch nach vier Wochen Therapie ( $T_2B_3$ ) der Pla-Gruppe

Demnach wurden die unabhängigen Variablen ( $t_3$ :Beta), ( $t_4$ :Iva) und ( $t_4$ :Beta) zusammen mit ihren Koeffizienten  $a_7$ ,  $a_8$  und  $a_9$  aus Modell 2 entfernt, da sie nicht signifikant zum Modell beitrugen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Verstorbene Tiere

Von den 90 adulten, männlichen New-Zealand-White Kaninchen sind im Verlauf der Versuchsreihe insgesamt 38 Tiere verstorben, wobei 10 Tiere (8 Sham-, 1 Pla-, 1 Iva-Gruppe) vor der ersten Messung verstarben. Acht Tiere (2 Sham-, 4 Pla-, 1 Beta- und 1 Iva-Gruppe) verstarben vor der ersten Medikation und vier Tiere (2 Pla-, 1 Beta-, 1 Iva-Gruppe) vor Ende des ersten Versuches. Weitere sechs Tiere (1 Pla-, 5 Iva-Gruppe) sind nicht aus der Narkose erwacht, sieben Tiere (2 Sham-, 2 Pla-, 1 Beta- und 2 Iva-Gruppe) sind in den folgenden vier Wochen verstorben und drei Tiere (2 Beta- und 1 Iva-Gruppe) vor Messungen des zweiten Versuches (Abb. 11).

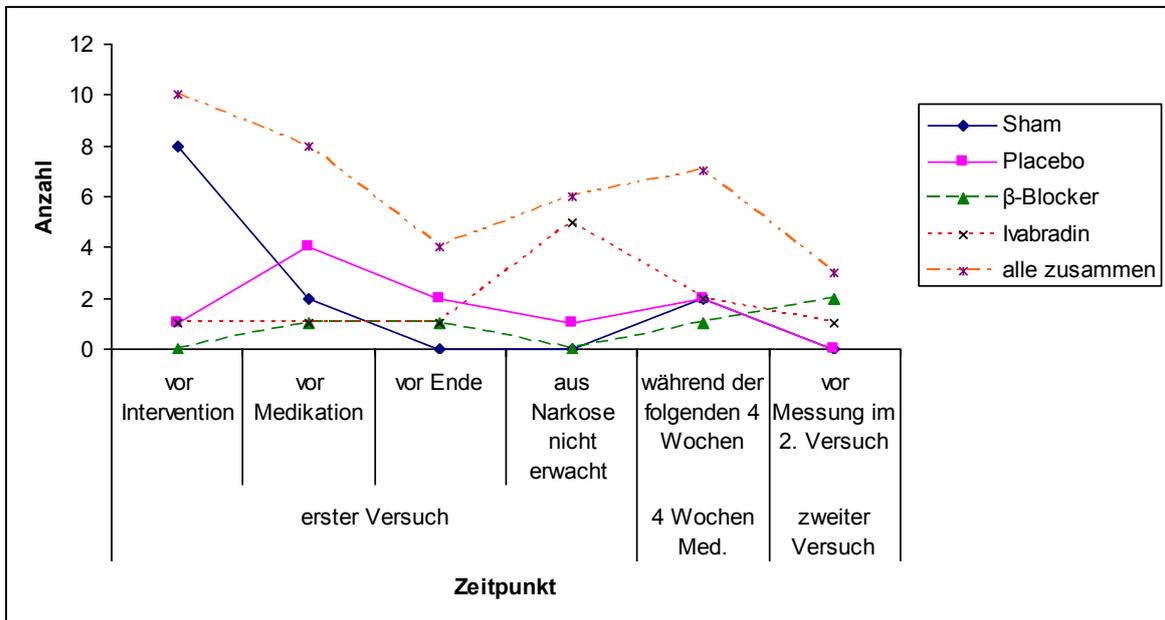


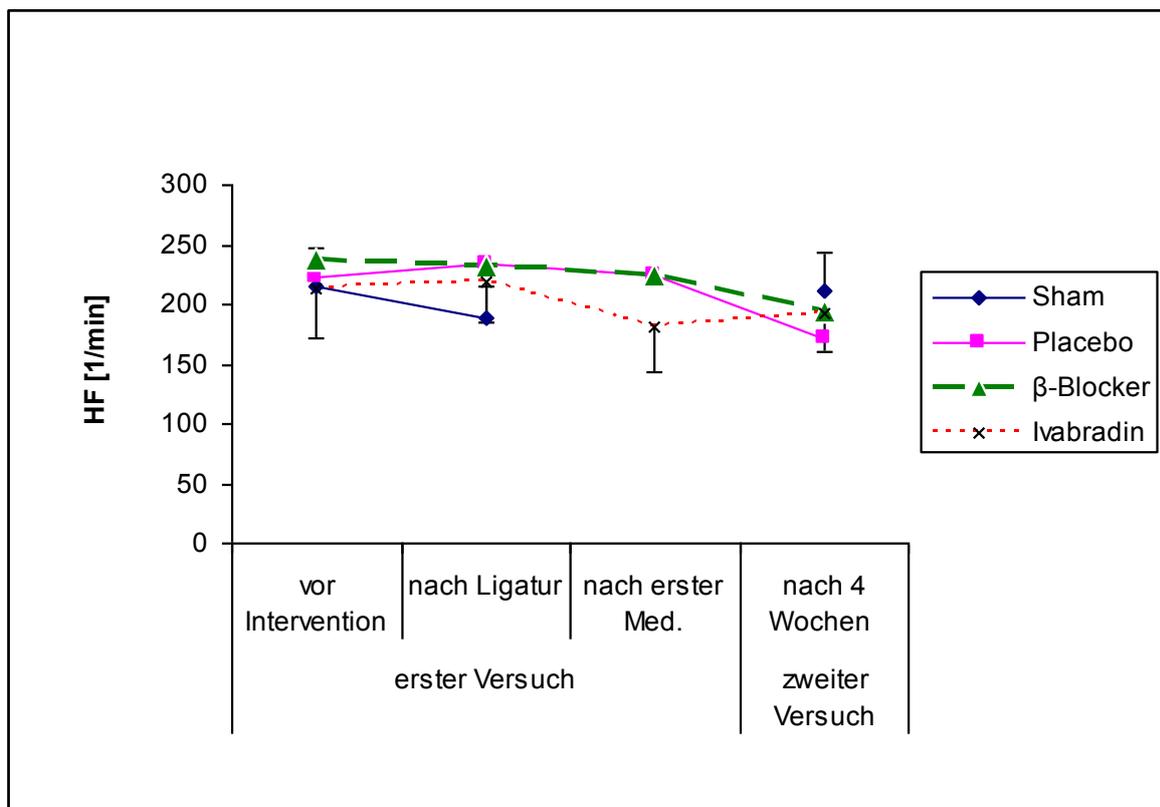
Abb. 11: Anzahl und Zeitpunkt der verstorbenen Tiere

#### 3.2 Deskriptive Beschreibung der Daten

Hierbei geht es um die hämodynamischen Größen 'Herzfrequenz' und 'maximaler links-ventrikulärer Druck' und um die Maße der Herzfrequenzvariabilität 'Standardabweichung der NN-Intervalle' und 'Quadratwurzel des Mittelwertes der Summe der quadrierten Differenzen zwischen benachbarten NN-Intervallen'.

### 3.2.1 Herzfrequenz

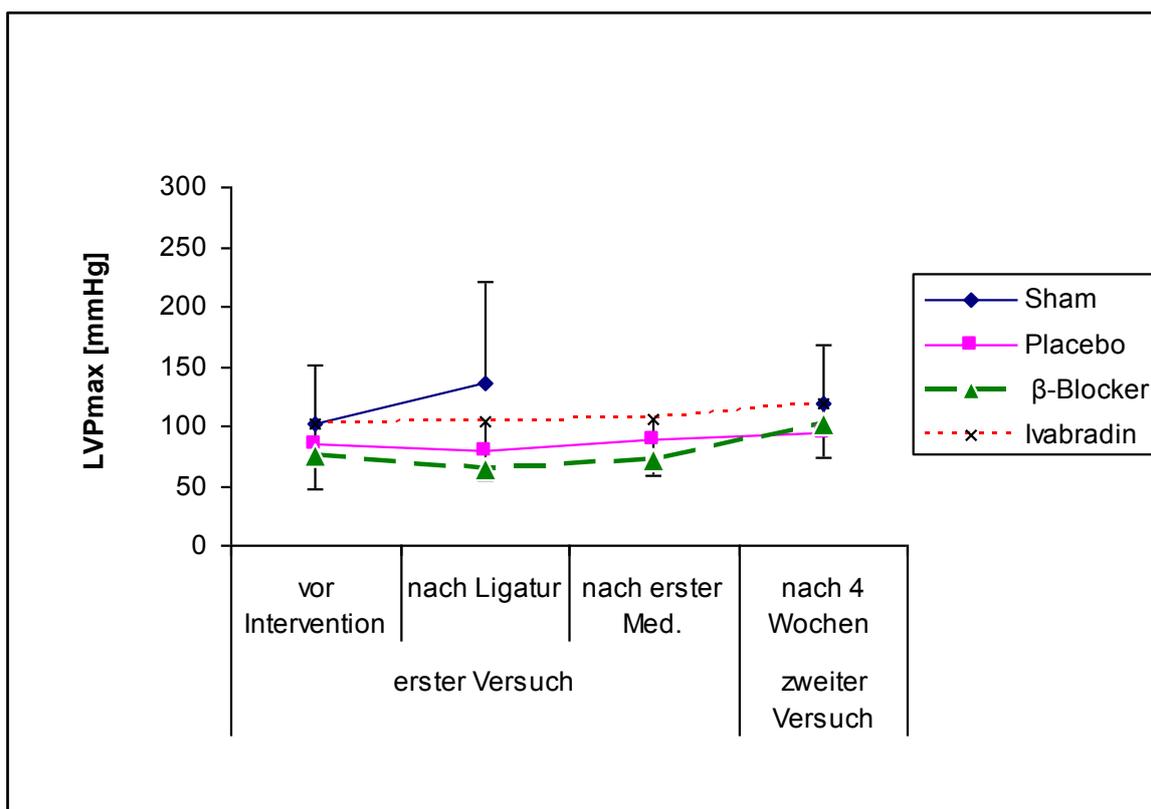
Die Ausgangswerte für die durchschnittliche Herzfrequenz (HF) unterschieden sich in den vier Versuchsgruppen (Sham-, Pla-, Beta- und Iva-Gruppe) nicht signifikant voneinander (Abb. 12). Die HF war bis zum Setzen der Ligatur konstant und lag bei der Sham-Gruppe (n=7) bei  $216 \pm 32 \text{ min}^{-1}$ , bei der Pla-Gruppe (n=8) bei  $223 \pm 26 \text{ min}^{-1}$ , bei der Beta-Gruppe (n=5) bei  $238 \pm 29 \text{ min}^{-1}$  und bei der Iva-Gruppe (n=13) bei  $214 \pm 43 \text{ min}^{-1}$ . In der Sham-Gruppe (n=3) sank die HF nach Ausführen des Sham-Manövers um 12,5 % ( $189 \pm 26 \text{ min}^{-1}$ ), in den anderen drei Gruppen traten geringere Veränderungen auf (Pla-Gruppe (n=8)  $234 \pm 21 \text{ min}^{-1}$ , Beta-Gruppe (n=5)  $233 \pm 17 \text{ min}^{-1}$  und Iva-Gruppe (n=14)  $218 \pm 33 \text{ min}^{-1}$ ). Während die HF sowohl nach Placebo- als auch nach Metoprololgabe nur leicht sank (Pla-Gruppe (n=3):  $225 \pm 27 \text{ min}^{-1}$ , Beta-Gruppe (n=5):  $225 \pm 19 \text{ min}^{-1}$ ), kam es nach Ivabradinabgabe zu einer beabsichtigten Abnahme der HF um 17 % auf  $181 \pm 37 \text{ min}^{-1}$ . Nach vier Wochen waren die HF-Veränderungen der Sham-Gruppe (n=8) vollständig reversibel ( $212 \pm 32 \text{ min}^{-1}$ ), die anderen Gruppen hatten eine im Vergleich zum Ausgangswert verringerte HF (Pla-Gruppe (n=7)  $172 \pm 35 \text{ min}^{-1}$  (23 % geringer), Beta-Gruppe (n=9)  $195 \pm 56 \text{ min}^{-1}$  (18 % geringer) und Iva-Gruppe (n=15)  $192 \pm 31 \text{ min}^{-1}$  (10 % geringer).



**Abb. 12:** Herzfrequenz (HF) während der verschiedenen Messzeitpunkte. Computer-gestützte HF-Werte für die Sham-Gruppe nach der ersten 'Medikation' liegen nicht vor

### 3.2.2 Maximaler linksventrikulärer Druck

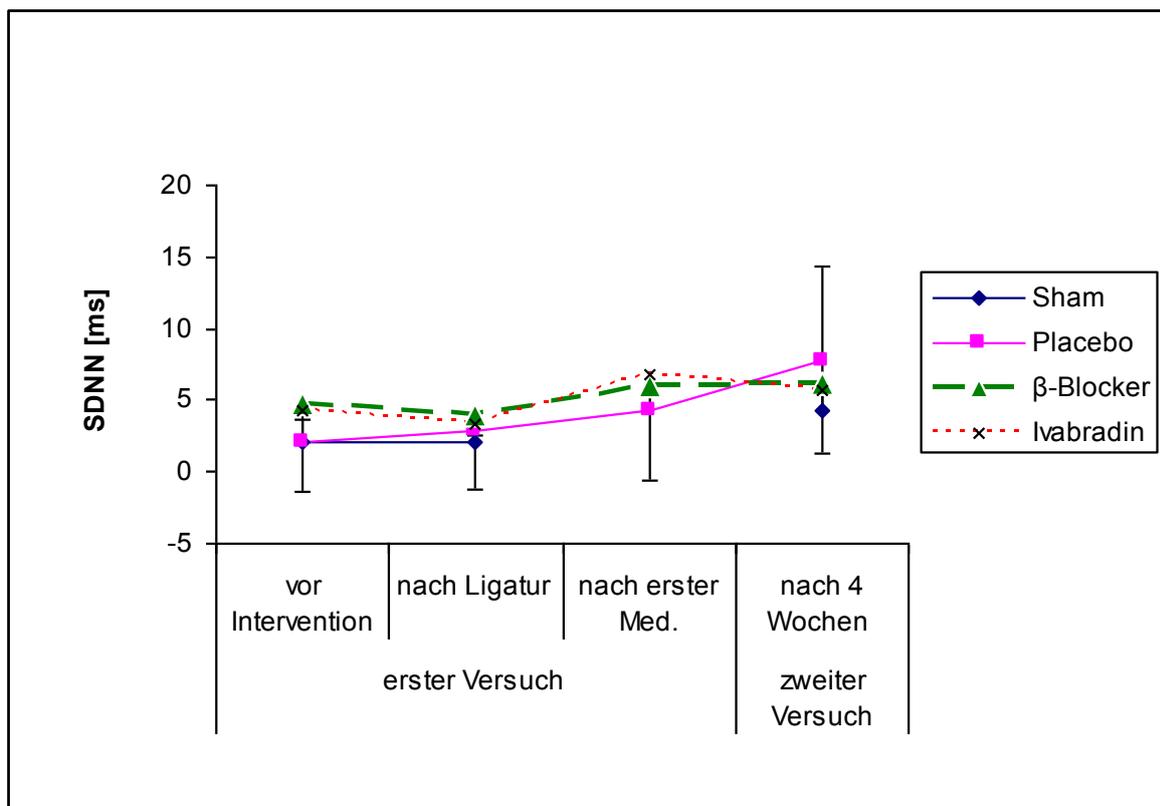
Die Ausgangswerte des maximalen linksventrikulären Druckes ( $LVP_{max}$ ) lagen bei den Gruppen zwischen 85 und 102 mmHg (Sham-Gruppe (n=7):  $102 \pm 49$  mmHg, Placebo-Gruppe (n=8):  $85 \pm 13$  mmHg, Beta-Gruppe (n=5):  $76 \pm 14$  mmHg und Iva-Gruppe (n=11):  $100 \pm 54$  mmHg) (Abb. 13). In der Sham-Gruppe (n=3) kam es zum Zeitpunkt des Sham-Manövers zu einem Anstieg von  $LVP_{max}$  auf  $135 \pm 85$  mmHg; der  $LVP_{max}$  in der Pla-Gruppe (n=8) sowie in der Beta-Gruppe (n=5) nahm um etwa 8 mmHg ab. In der Iva-Gruppe (n=11) blieb  $LVP_{max}$  mit  $103 \pm 49$  mmHg annähernd konstant. Nach erster Medikamentengabe kam es in allen Gruppen zu einem leichten Anstieg des  $LVP_{max}$  (Pla-Gruppe (n=3):  $89 \pm 8$  mmHg, Beta-Gruppe (n=5):  $72 \pm 16$  mmHg und Iva-Gruppe (n=11):  $105 \pm 47$  mmHg). Nach vier Wochen war  $LVP_{max}$  in allen vier Gruppen im Vergleich zum Ausgangswert um mindestens 10 % angestiegen (Sham-Gruppe (n=8):  $119 \pm 49$  mmHg, Pla-Gruppe (n=7):  $94 \pm 26$  mmHg, Beta-Gruppe (n=9):  $102 \pm 25$  mmHg und Iva-Gruppe (n=15):  $119 \pm 45$  mmHg). In der Beta-Gruppe betrug der Anstieg 34 %.



**Abb. 13:** Maximaler linksventrikulärer Druck ( $LVP_{max}$ ) zu den verschiedenen Messzeitpunkten

### 3.2.3 Standardabweichung der NN-Intervalle

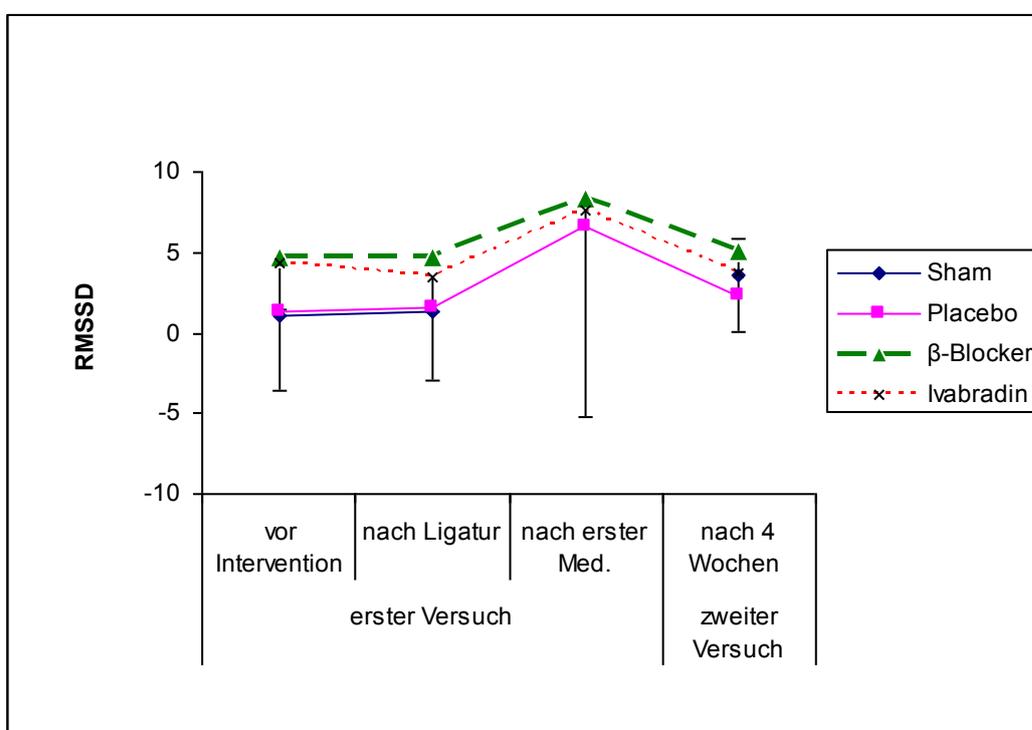
Während die Standardabweichung der NN-Intervalle (SDNN) zum Kontrollzeitpunkt bei der Sham-Gruppe (n=7) und bei der Pla-Gruppe (n=8) ungefähr  $2,08 \pm 2,34$  ms betrug, lagen die Ausgangswerte der Beta-Gruppe (n=5) und der Iva-Gruppe (n=11) deutlich höher (Beta-Gruppe  $4,67 \pm 1,67$  ms, Iva-Gruppe  $4,29 \pm 5,67$  ms) (Abb. 14). Zum Zeitpunkt des Sham-Manövers und der Ligatur blieb die SDNN in der Sham-Gruppe (n=3) konstant ( $2,08 \pm 0,44$  ms), und in der Pla-Gruppe (n=8) stieg sie auf  $2,79 \pm 2,66$  ms an. Sowohl in der Beta-Gruppe (n=5) als auch in der Iva-Gruppe (n=14) fiel die SDNN ab (Beta-Gruppe  $3,96 \pm 3,72$  ms; Iva-Gruppe  $3,30 \pm 4,60$  ms). Während sich SDNN nach Placebo- (n=3) und Metoprololgabe (n=5) auf Werte von  $4,29 \pm 6,14$  ms (Pla-Gruppe) und  $6,01 \pm 6,30$  (Beta-Gruppe) nur mäßig erhöhte, kam es nach Ivabradin-gabe (n=14) zu einem mehr als 100 %igen Anstieg ( $6,72 \pm 7,25$  ms). Nach vier Wochen lagen die SDNN-Werte aller vier Gruppen deutlich über deren Ausgangsniveau (Sham-Gruppe (n=8):  $4,22 \pm 10,11$  ms, Placebo-Gruppe (n=7):  $7,66 \pm 5,93$  ms, Beta-Gruppe (n=9):  $6,22 \pm 5,67$  ms und Iva-Gruppe (n=15):  $5,73 \pm 4,43$  ms). In der Placebo-Gruppe kam es unter der NaCl-Gabe zu einem weiteren SDNN-Anstieg, während in der Beta-Gruppe und in der Iva-Gruppe die Werte relativ konstant blieben.



**Abb. 14:** Standardabweichung der NN-Intervalle (SDNN) zu den verschiedenen Messzeitpunkten

### 3.2.4 Quadratwurzel des Mittelwertes der Summe der quadrierten Differenzen zwischen benachbarten NN-Intervallen (RMSSD)

Die Ausgangswerte für die RMSSD lagen bei der Sham-Gruppe (n=7) bei  $1,07 \pm 0,39$  und bei der Placebo-Gruppe bei  $1,30 \pm 0,87$  (Abb. 15). Ähnlich wie bei SDNN, lagen die Ausgangswerte der Beta-Gruppe (n=5) und der Iva-Gruppe (n=13) auf einem deutlich höheren Niveau ( $4,73 \pm 4,66$  (Beta-Gruppe),  $4,30 \pm 7,85$  (Iva-Gruppe)). Nach Sham-Manöver oder Ligatur stieg die RMSSD der ersten beiden Gruppen um ungefähr 18 % an (Sham-Gruppe (n=3):  $1,27 \pm 0,11$ , Pla-Gruppe (n=8):  $1,55 \pm 1,17$ ), bei der Beta-Gruppe blieb sie konstant, während die RMSSD in der Iva-Gruppe (n=14) um 20 % auf  $3,44 \pm 6,44$  absank. Nach erster Medikamentengabe kam es in allen Gruppen zu einem starken Anstieg der RMSSD (Pla-Gruppe (n=3):  $6,59 \pm 10,23$ , Beta-Gruppe (n=5):  $8,36 \pm 9,92$  und Iva-Gruppe (n=14):  $7,58 \pm 12,77$ ). Nach vier Wochen war dieser starke Anstieg der RMSSD in allen vier Gruppen rückläufig; die RMSSD lag aber bei der Sham-Gruppe (n=8) und der Placebo-Gruppe (n=7) noch deutlich ( $3,53 \pm 2,28$  (Sham-Gruppe),  $2,35 \pm 2,72$  (Pla-Gruppe)), bei der Beta-Gruppe (n=5;  $5,15 \pm 4,66$ ) jedoch nur noch geringfügig über deren Ausgangsniveau. In der Iva-Gruppe (n=15) waren die RMSSD-Veränderungen vollständig reversibel ( $3,67 \pm 3,61$ ).



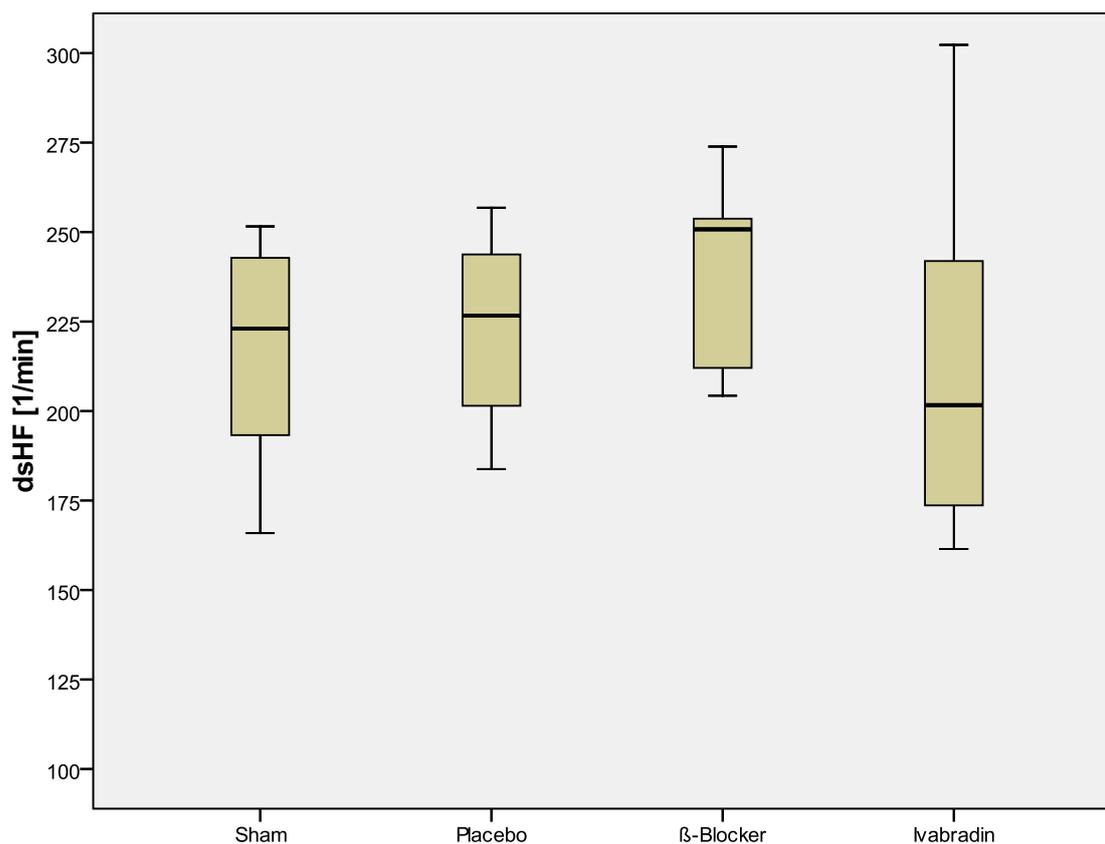
**Abb. 15:** Quadratwurzel des Mittelwertes der Summe der quadrierten Differenzen zwischen benachbarten NN-Intervallen [RMSSD] zu den verschiedenen Messzeitpunkten

### 3.3 Normalverteilung

Die Prüfung auf Normalverteilung mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test mit Signifikanzkorrektur nach Lillifors ergab für die durchschnittliche Herzfrequenz (dsHF) normalverteilte Daten ( $p=0,200$  zum Kontrollzeitpunkt). Während der Median für die dsHF der Sham-Gruppe ( $n=7$ ) bei  $223 \text{ min}^{-1}$  und der für die Pla-Gruppe ( $n=8$ ) bei  $227 \text{ min}^{-1}$  lag, befand sich der Median der Beta-Gruppe ( $n=5$ ) bei  $251 \text{ min}^{-1}$  und der der Iva-Gruppe ( $n=13$ ) bei  $202 \text{ min}^{-1}$  (Tab. 9, Abb. 18). Die Interquantilbereiche der Sham-, der Placebo- und der Beta-Gruppe waren annähernd gleich und betragen im Mittel  $54 \text{ min}^{-1}$ ; bei der Iva-Gruppe war der Bereich deutlich größer und lag bei  $75 \text{ min}^{-1}$ . Zur besseren Übersicht sind diese Werte zusätzlich in Tab. 9 zusammengefasst und in Abb. 16 graphisch dargestellt.

**Tab. 9:** Übersicht der dsHF der vier Versuchsgruppen zum Kontrollzeitpunkt.

vor Intervention (Kontrollzeitpunkt)	dsHF [1/min]			
	Sham	Placebo	$\beta$ -Blocker	Ivabradin
n	7	8	5	13
Median	223	227	251	202
Minimum	166	184	204	161
Maximum	252	257	274	302
Perzentile 25	191	197	208	174
Perzentile 75	244	248	264	248
Interquantilbereich	53	52	56	75



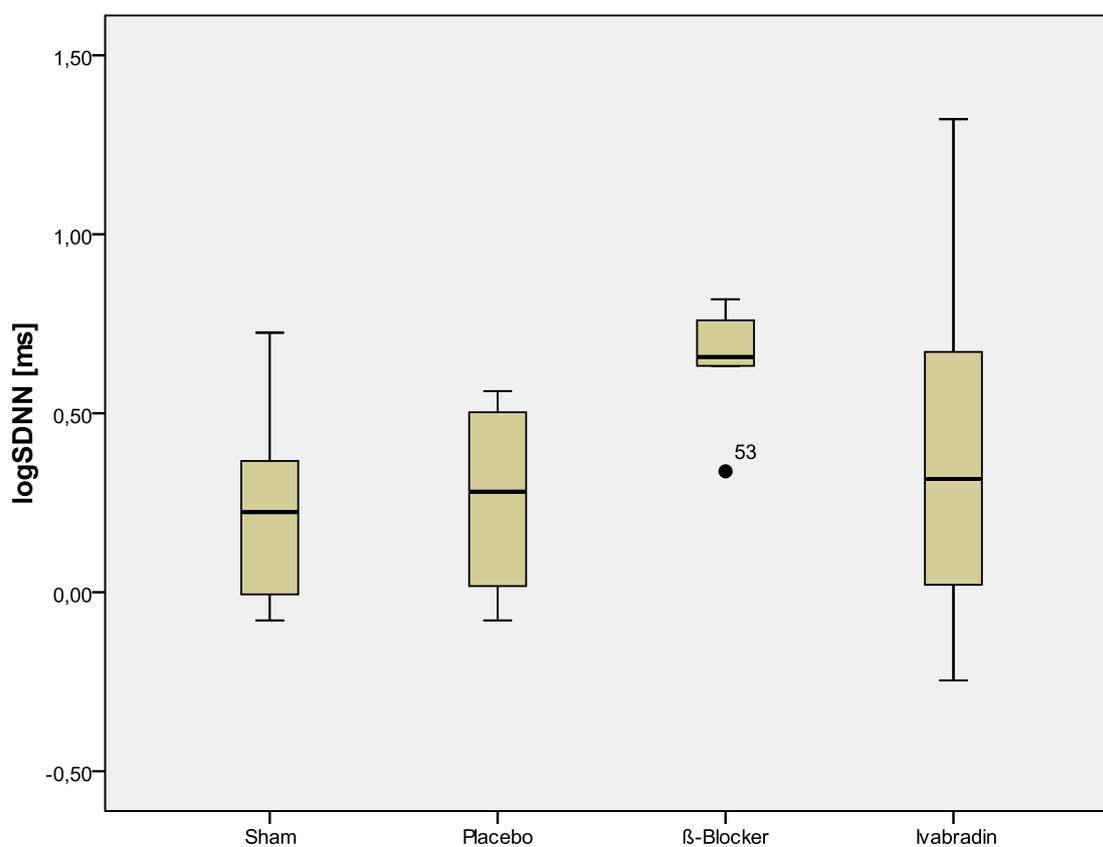
**Abb. 16:** dsHF [1/min] aller Versuchsgruppen zum Kontrollzeitpunkt.

Die  $LVP_{max}$ -, SDNN- und RMSSD-Daten in den verschiedenen Gruppen waren nicht normalverteilt ( $LVP_{max}$ :  $p=0,001$ , SDNN:  $p=0,000$ , RMSSD:  $p=0,000$ ), so dass sie logarithmiert und nochmals auf Normalverteilung geprüft wurden. Danach konnte für die logSDNN-Daten ( $p=0,200$ ) von einer Normalverteilung ausgegangen werden.

Der Median der logSDNN zum Kontrollzeitpunkt lag bei der Sham-Gruppe, bei der Pla-Gruppe und bei der Iva-Gruppe annähernd auf demselben Niveau (Tab. 10, Abb. 17): Sham-Gruppe ( $n=7$ ): 0,22 ms, Pla-Gruppe ( $n=8$ ): 0,28 ms, Iva-Gruppe ( $n=13$ ): 0,32 ms. Der Median der logSDNN bei der Beta-Gruppe ( $n=5$ ) befand sich bei 0,66 ms. Die Interquartilbereiche lagen zwischen minimal 0,30 ms (Beta-Gruppe) und maximal 0,78 ms (Iva-Gruppe).

**Tab. 10:** Übersicht der logSDNN aller Versuchsgruppen zum Kontrollzeitpunkt

vor Intervention (Kontrollzeitpunkt)	logSDNN [ms]			
	Sham	Placebo	$\beta$ -Blocker	Ivabradin
n	7	8	5	13
Median	0,22	0,28	0,66	0,32
Minimum	-0,08	-0,08	0,34	-0,25
Maximum	0,72	0,56	0,82	1,32
Perzentile 25	-0,05	-0,01	0,49	0,01
Perzentile 75	0,37	0,52	0,79	0,79
Interquartilbereich	0,42	0,54	0,30	0,78

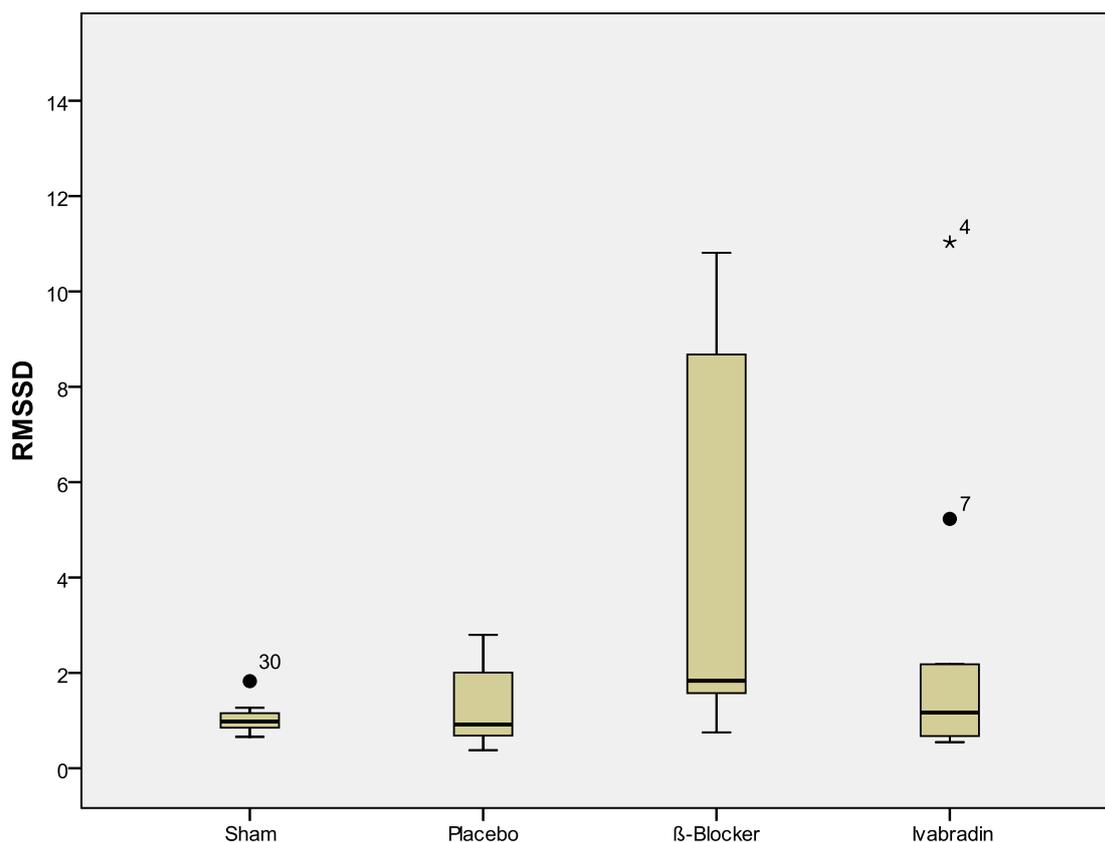
**Abb. 17:** logSDNN [ms] aller Versuchsgruppen zum Kontrollzeitpunkt (•: Ausreißer (Tier Nr. 53))

Zum Kontrollzeitpunkt ergab sich sowohl für die RMSSD-Rohdaten als auch die logarithmierten Daten keine Normalverteilung (Kontrollzeitpunkt:  $p = 0,000$  (RMSSD),  $p = 0,026$  (logRMSSD)), daher wird im Folgenden von den Rohdaten ausgegangen.

Während die RMSSD-Mediane der Sham-Gruppe (n=7) und der Pla-Gruppe zum Kontrollzeitpunkt annähernd auf dem gleichen Niveau (Sham-Gruppe: 0,98, Pla-Gruppe: 0,92) lagen, befanden sie sich bei der Beta-Gruppe (n=5) und bei der Iva-Gruppe (n=13) auf einem höheren Niveau (Beta-Gruppe: 1,83, Iva-Gruppe: 1,17 (Tab. 11, Abb. 28)). Die Iva-Gruppe war gekennzeichnet durch mehrere Ausreißer (Tier Nr. 4, Tier Nr. 7), wobei der Maximalwert durch einen extremen Ausreißer (Tier Nr. 5) zustande kam. Der Interquantilbereich betrug bei den verschiedenen Versuchsreihen: Sham-Gruppe 0,50, Pla-Gruppe 1,47, Beta-Gruppe 8,58 und Iva-Gruppe 3,05.

**Tab. 11:** Übersicht RMSSD aller Versuchsgruppen zum Kontrollzeitpunkt, \*: extremer Ausreißer: Ivabradin Nr.5

vor Intervention (Kontrollzeitpunkt)	RMSSD			
	Sham	Placebo	$\beta$ -Blocker	Ivabradin
n	7	8	5	13
Median	0,98	0,92	1,83	1,17
Minimum	0,66	0,38	0,75	0,55
Maximum	1,83	2,80	10,81	28,56*
Perzentile 25	0,77	0,64	1,16	0,66
Perzentile 75	1,27	2,11	9,74	3,70
Interquantilbereich	0,50	1,47	8,58	3,05



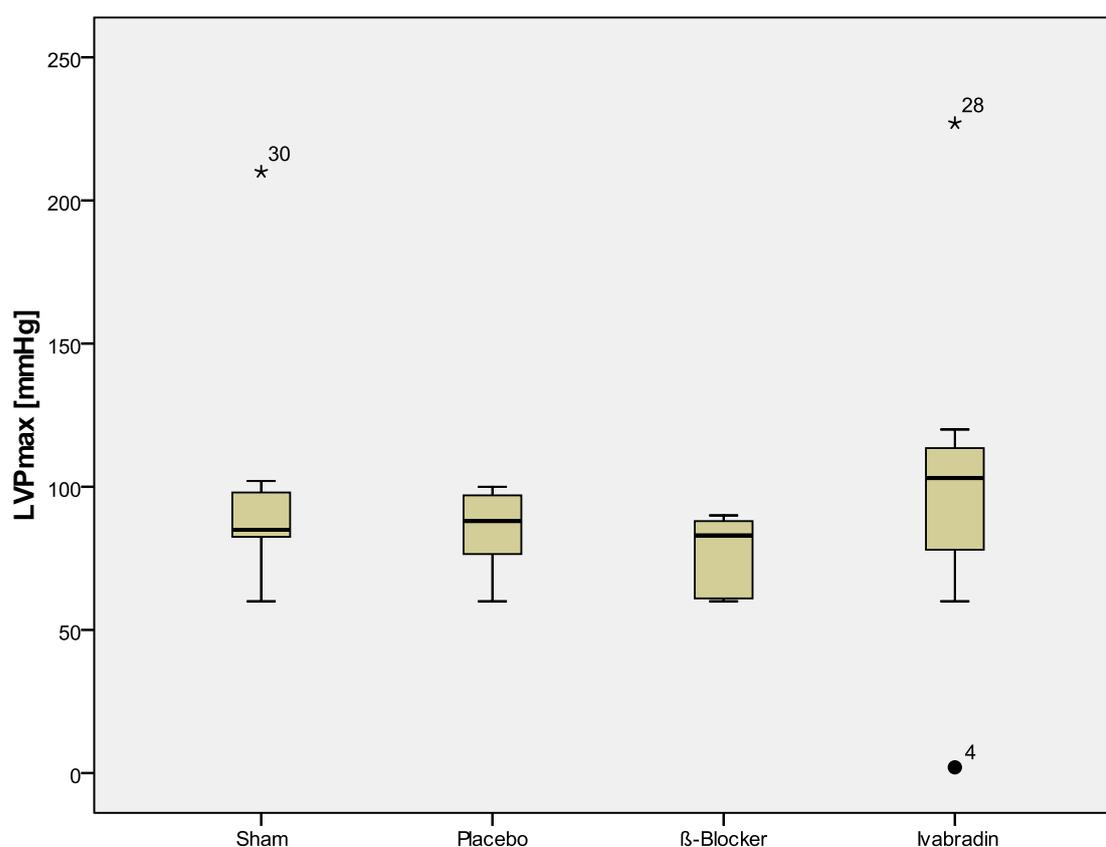
**Abb. 18:** RMSSD aller Versuchsgruppen zum Kontrollzeitpunkt (\*: extremer Ausreißer (Tier Nr. 4), •: Ausreißer (Tier Nr. 30 und Nr. 7)). Extremer Ausreißer: Ivabradin Nr.5: 28,56 (außerhalb der Skala)

Sowohl  $LVP_{max}$  als auch  $\log LVP_{max}$  ergaben nach der Kolmogorov-Smirnov-Testung mit Signifikanzkorrektur nach Lillifors keine normalverteilten Daten (Kontrollzeitpunkt:  $p=0,001$  ( $LVP_{max}$ ) und  $p=0,000$  ( $\log LVP_{max}$ )). Daher werden auch hier die Rohdaten für die weiteren Auswertungen verwendet.

Während sich die  $LVP_{max}$ -Mediane der Sham-Gruppe ( $n=7$ ), der Pla-Gruppe ( $n=8$ ) und der Beta-Gruppe ( $n=5$ ) im Mittel bei 85 mmHg befanden, lag der Median in der Iva-Gruppe ( $n=11$ ) mit 103 mmHg auf einem höheren Niveau (Tab. 12, Abb. 19). Bei der Iva-Gruppe kamen sowohl der Minimalwert von 2 mmHg (Tier Nr. 4) als auch der Maximalwert von 227 mmHg (Tier Nr. 28) durch Ausreißer zustande. Der Interquantilbereich lag zwischen minimal 20 (Sham-Gruppe) und maximal 51 (Iva-Gruppe).

**Tab. 12:** Übersicht der  $LVP_{max}$  aller Versuchsreihen zum Kontrollzeitpunkt

vor Intervention Kontrollzeitpunkt	$LVP_{max}$ [mmHg]			
	Sham	Placebo	$\beta$ -Blocker	Ivabradin
n	7	8	5	11
Median	85	88	83	103
Minimum	60	60	60	2
Maximum	210	100	90	227
Perzentile 25	82	76	61	64
Perzentile 75	102	98	89	115
Interquantilbereich	20	22	29	51

**Abb. 19:**  $LVP_{max}$  aller Versuchsgruppen zum Kontrollzeitpunkt (\*: extremer Ausreißer (Tier Nr. 30 und Nr.28), •: Ausreißer (Tier Nr.4)).

Zusammenfassend kann man bei den Variablen dsHF und logSDNN von einer Normalverteilung zu allen Messzeitpunkten ausgehen, während die Variablen  $LVP_{max}$ ,  $\log LVP_{max}$ , RMSSD und  $\log RMSSD$  nicht normalverteilt waren. Für die weitere Testung wurden deshalb die dsHF-,  $LVP_{max}$ -, logSDNN- und die RMSSD-Werte verwendet. Um vergleichbare Aussagen tätigen zu können, wurde deshalb auf nicht-parametrische Tests zurückgegriffen. Anschließend erfolgte bei den normalverteilten Daten eine weitere

Testung durch ein Mixed-effects-Modell, welches eine deutlich bessere Teststärke als die nicht-parametrischen Tests aufweist, aber eine Normalverteilung voraussetzt.

### 3.4 Kruskal-Wallis-Test auf Homogenität zum Kontrollzeitpunkt ( $T_1B_0$ )

Zum Kontrollzeitpunkt ( $T_1B_0$ ) bestanden bei allen vier Parametern (dsHF,  $LVP_{max}$ , logSDNN und RMSSD) keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Untersuchungsgruppen:  $p=0,496$  (dsHF),  $p=0,243$  ( $LVP_{max}$ ),  $p=0,170$  (logSDNN),  $p=0,450$  (RMSSD). Es kann von einer Homogenität der Daten ausgegangen werden.

### 3.5 Mann-Whitney-U-Test und Kruskal-Wallis-Test:

**Unterschiede bei den verschiedenen Gruppen zu den Zeitpunkten Sham-Manöver/Ligatur ( $T_1B_1$ ), nach erster Medikamentengabe ( $T_1B_2$ ) und nach vierwöchiger Therapie ( $T_2B_3$ ) in Relation zum Kontrollzeitpunkt ( $T_1B_0$ )**

#### 3.5.1 Zeitpunkt $T_1B_1$ (Sham-Manöver/Ligatur) minus $T_1B_0$ (Kontrollzeitpunkt)

Zum Zeitpunkt  $T_1B_1$  (Sham-Manöver/Ligatur) wurden die Pla-, Beta- und Iva-Gruppen zu einer Gruppe zusammengefasst und der Sham-Gruppe gegenübergestellt, da bei den ersten drei Gruppen im Gegensatz zur Sham-Gruppe eine Ligatur durchgeführt wurde. Anschließend erfolgte die Testung mittels des Mann-Whitney-U-Tests. Bei allen vier Variablen (dsHF,  $LVP_{max}$ , logSDNN und RMSSD) waren die Veränderungen der zwei Gruppen (Sham-Gruppe/Ligatur-Gruppe) vom Zeitpunkt des Sham-Manövers oder der Ligatur in Bezug auf den Kontrollzeitpunkt nicht signifikant (dsHF:  $p=0,410$ ,  $LVP_{max}$ :  $p=0,071$ , logSDNN:  $p=0,299$  und RMSSD:  $p=0,516$ ).

#### 3.5.2 Zeitpunkt $T_1B_2$ (erste Medikamentengabe) minus $T_1B_0$ (Kontrollzeitpunkt)

Zum Zeitpunkt der ersten Medikamentengabe ( $T_1B_2$ ) wurden wiederum alle vier Gruppen (Sham-, Pla-, Beta- und Iva-Gruppe) einzeln betrachtet, und es wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test die Veränderung der einzelnen Gruppen vom Zeitpunkt  $T_1B_2$  in Bezug auf den Kontrollzeitpunkt analysiert. Auch hier konnten bei allen vier Variablen (dsHF,  $LVP_{max}$ , logSDNN und RMSSD) keine signifikanten Veränderungen vom Zeitpunkt  $T_1B_2$  in Bezug auf den Kontrollzeitpunkt festgestellt werden (dsHF:  $p=0,219$ ,  $LVP_{max}$ :  $p=0,707$ , logSDNN:  $p=0,579$  und RMSSD:  $p=0,960$ ).

### 3.5.3 Zeitpunkt T<sub>2</sub>B<sub>3</sub> (nach 4 Wochen Medikamentengabe) minus T<sub>1</sub>B<sub>0</sub> (Kontrollzeitpunkt)

Auch zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Analyse der Daten aller vier Gruppen mit dem Kruskal-Wallis-Test. Es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der vier Gruppen nach vier Wochen Medikamentengabe in Relation zum Kontrollzeitpunkt bei allen untersuchten Variablen. Der p-Wert für dsHF lag bei p=0,230, für LVP<sub>max</sub> bei p=0,402, für logSDNN bei p=0,665 und für RMSSD bei p=0,590.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass sich mit den bisherigen statistischen Verfahren bei den untersuchten Variablen (dsHF, LVP<sub>max</sub>, logSDNN und RMSSD) im Hinblick auf die verschiedenen Therapiegruppen keine signifikanten Veränderungen zu den Zeitpunkten (T<sub>1</sub>B<sub>1</sub>, T<sub>1</sub>B<sub>2</sub> und T<sub>2</sub>B<sub>3</sub>) in Relation zum Kontrollzeitpunkt feststellen ließen.

Um dennoch eventuelle Unterschiede darstellen zu können, wurde zusätzlich ein Mixed-effects-Modell bei den normalverteilten Parametern (HF und logSDNN) angewendet, da dieses Modell eine deutlich bessere Teststärke als der Mann-Whitney-U-Test oder der Kruskal-Wallis-Test aufweist.

## 3.6 Mixed-effects-Modell

### 3.6.1 Herzfrequenz

Nach Prüfung der Residuen auf Normalverteilung konnten die HF-Daten analysiert werden. Nach Vergleich beider Modelle zeigte sich, dass Modell 2 besser als Modell 1 geeignet war. Während das AIC (=Akaike information criterion) für Modell 1 bei 1200 lag, war das AIC bei Modell 2 mit 1195 (p= 0,01) etwas niedriger und damit etwas besser.

Die einzelnen Herzfrequenzen der verschiedenen Therapiegruppen und Kaninchen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten sind in Abb. 20 zusammengestellt.

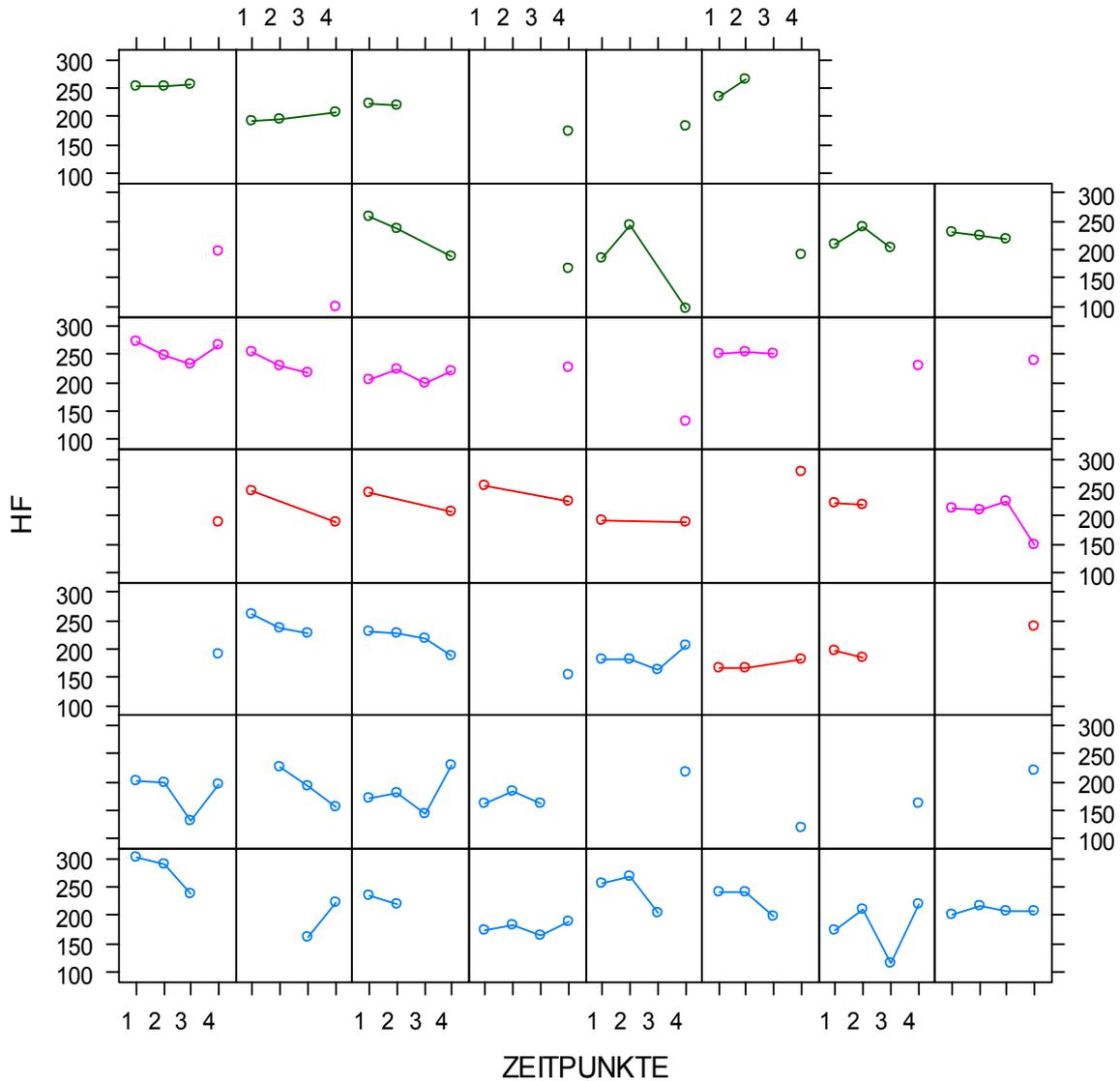
Nach schrittweiser Entfernung aller nicht relevanten Variablen aus Modell 2 (Rückwärts-Selektion), ergab sich das dritte Modell:

#### Modell 3:

$$HF = 219,49 + 5,53 \cdot t_2 - 4,71 \cdot t_3 - 21,40 \cdot t_4 - 19,62 \cdot (t_2:\text{Sham}) - 27,70 \cdot (t_3:\text{lva}) - 22,04 \cdot (t_4:\text{Plac}).$$

Bei der Modellkonstanten (219,49) handelt es sich um den Koeffizienten der unabhängigen Variablen t<sub>1</sub>, welche der dsHF zum Kontrollzeitpunkt (T<sub>1</sub>B<sub>0</sub>) entspricht. Der Zeitpunkt des

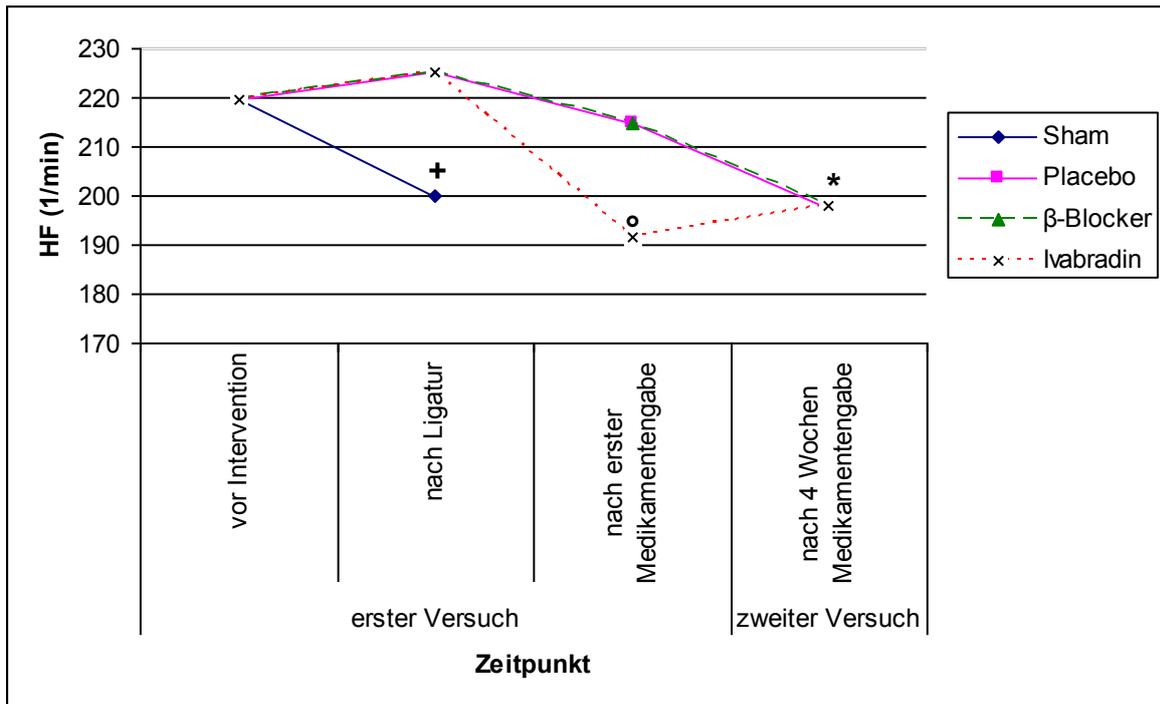
Sham-Manövers/der Ligatur ( $T_1B_1$ ) aller Versuchsgruppen wird durch  $t_2$  gekennzeichnet,  $t_3$  steht für den Zeitpunkt der ersten Medikamentengabe ( $T_1B_2$ ) aller Versuchsgruppen und  $t_4$  für den letzten Messzeitpunkt nach vierwöchiger Therapie ( $T_2B_3$ ). Das Sham-Manöver (Zeitpunkt  $T_1B_1$ ) der Sham-Gruppe ist durch ( $t_2$ :Sham) gekennzeichnet, die erste Medikamentengabe (Zeitpunkt  $T_1B_2$ ) der Iva-Gruppe durch ( $t_3$ :Iva), und bei ( $t_4$ :Plac) handelt es sich um den Zeitpunkt  $T_2B_3$  (2. Versuch nach vierwöchiger Therapie) der Placebo-Gruppe.



**Abb. 20:** HF [1/min] der einzelnen Versuchstiere der verschiedenen Versuchsgruppen (grün: Pla-Gruppe (n=12), rosa: Beta-Gruppe (n=11), rot: Sham-Gruppe (n=10), blau: Iva-Gruppe (n=21)) zu den verschiedenen Zeitpunkten (1 = Kontrollzeitpunkt ( $T_1B_0$ ); 2 = Sham-Manöver/Ligatur ( $T_1B_1$ ); 3 = nach einmaliger Medikamentengabe ( $T_1B_2$ ); 4 = 2. Versuch nach vier Wochen Therapie ( $T_2B_3$ ))

Das AIC betrug bei diesem dritten Modell 1190 bei einer logLikelihood von -577, während das AIC des unveränderten zweiten Modells 1195 und die logLikelihood -576 betrug. Wegen des geringfügig verminderten AIC ist das Modell 3 dem Modell 2 vorzuziehen.

Während sich im Modell 3 (Abb. 21) die Zeitpunkte Sham-Manöver/Ligatur ( $T_1B_1$ ) und erste Medikamentengabe ( $T_1B_2$ ) im Allgemeinen vom Kontrollzeitpunkt nicht signifikant unterschieden (Sham-Manöver/Ligatur:  $p=0,178$ ; erste Medikamentengabe:  $p=0,504$ ), bestand zum Zeitpunkt  $T_2B_3$  (2. Versuch nach vier Wochen Therapie) ein signifikanter Unterschied ( $p=0,098$ ) der Therapiegruppen vom letzten Messzeitpunkt zum Kontrollzeitpunkt. Die HF der Untersuchungsgruppen sank von einem Ausgangswert von  $220 \text{ min}^{-1}$  (Kontrollzeitpunkt) um 10 % auf  $198 \text{ min}^{-1}$  (Sham-, Beta- und Iva-Gruppe) und auf  $198 \text{ min}^{-1}$  (Pla-Gruppe). Weiterhin unterschied sich zum Zeitpunkt des Sham-Manövers oder der Ligatur die Sham-Gruppe signifikant ( $p=0,312$ ) von den drei Ligaturgruppen (Placebo-, Beta- und Iva-Gruppe). Hier kam es zu einem HF-Abfall in der Sham-Gruppe auf  $120 \text{ min}^{-1}$  im Vergleich zu den drei Ligaturgruppen ( $225 \text{ min}^{-1}$ ). Außerdem ergab sich ein signifikanter Unterschied nach erster Ivabradin-Gabe ( $p=0,0017$ ) im Vergleich zu den anderen zwei Therapiegruppen (Pla- und Beta-Gruppe). Die HF sank um 13 % nach erster Gabe von Ivabradin auf  $192 \text{ min}^{-1}$ , während in den anderen Gruppen die HF nur leicht auf  $215 \text{ min}^{-1}$  sank. Die HF-Streuung bei den einzelnen Kaninchen zu den verschiedenen Messzeitpunkten sah folgendermaßen aus: Zum Kontrollzeitpunkt betrug die Standardabweichung  $33 \text{ min}^{-1}$ , zum Zeitpunkt des Sham-Manövers oder der Ligatur  $16 \text{ min}^{-1}$ , nach erster Medikamentengabe  $20 \text{ min}^{-1}$  und beim letzten Messzeitpunkt nach 4-wöchiger Therapie  $42 \text{ min}^{-1}$  (Anhang 1).

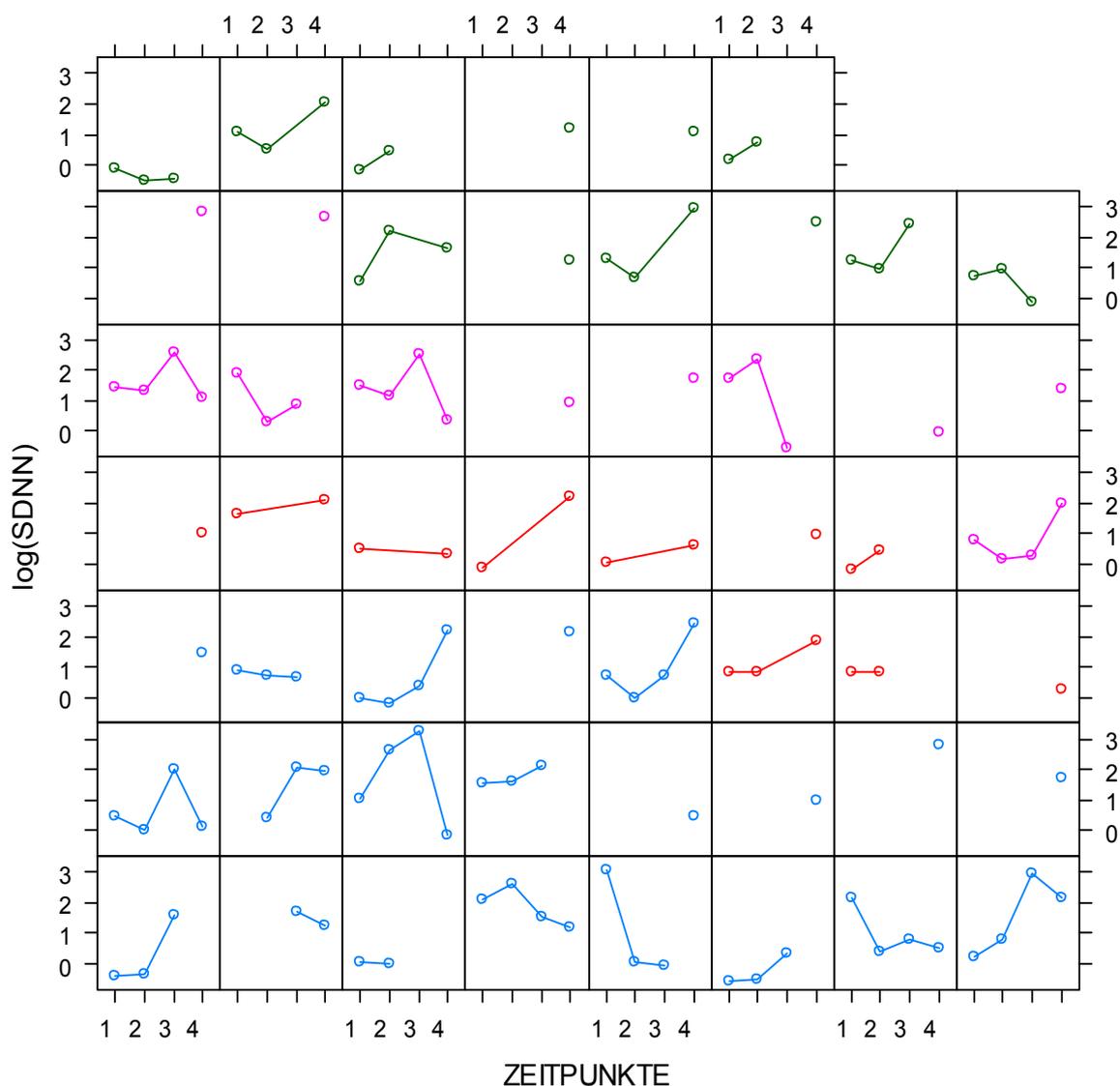


**Abb. 21:** HF [1/min] im Modell 3 (Mixed-effects-Modell)  
 \* Signifikante Unterschiede der Therapiegruppen vom letzten Messzeitpunkt zum Kontrollzeitpunkt ( $p=0,098$ ), + der Sham-Gruppe zum Zeitpunkt des Sham-Manövers/Ligatur ( $p=0,312$ ) von den 3 Ligaturgruppen und ° der Iva-Gruppe nach erster Ivabradingabe ( $p=0,0017$ ) im Vergleich zu den anderen zwei Therapiegruppen (Pla- und Beta-Gruppe)

### 3.6.2 logSDNN

Nach Prüfung der Residuen auf Normalverteilung wurden die logSDNN-Daten analysiert. Nach Vergleich beider Modelle zeigte sich, dass Modell 1 besser geeignet war als Modell 2. Das AIC in Modell 1 betrug 335, während es bei Modell 2 mit 342 etwas höher lag ( $p=0,5563$ ).

Die logSDNN-Werte der verschiedenen Therapiegruppen und Kaninchen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten sind in Abb. 22 zusammengestellt.



**Abb. 22:** logSDNN der einzelnen Versuchstiere der verschiedenen Versuchsgruppen (grün: Pla-Gruppe (n=12), rosa: Beta-Gruppe (n=11), rot: Sham-Gruppe (n=10), blau: Iva-Gruppe (n=21)) zu den verschiedenen Zeitpunkten (1 = Kontrollzeitpunkt ( $T_1B_0$ ); 2 = Sham-Manöver/Ligatur ( $T_1B_1$ ); 3 = nach einmaliger Medikamentengabe ( $T_1B_2$ ); 4 = 2. Versuch nach vier Wochen Therapie ( $T_2B_3$ ))

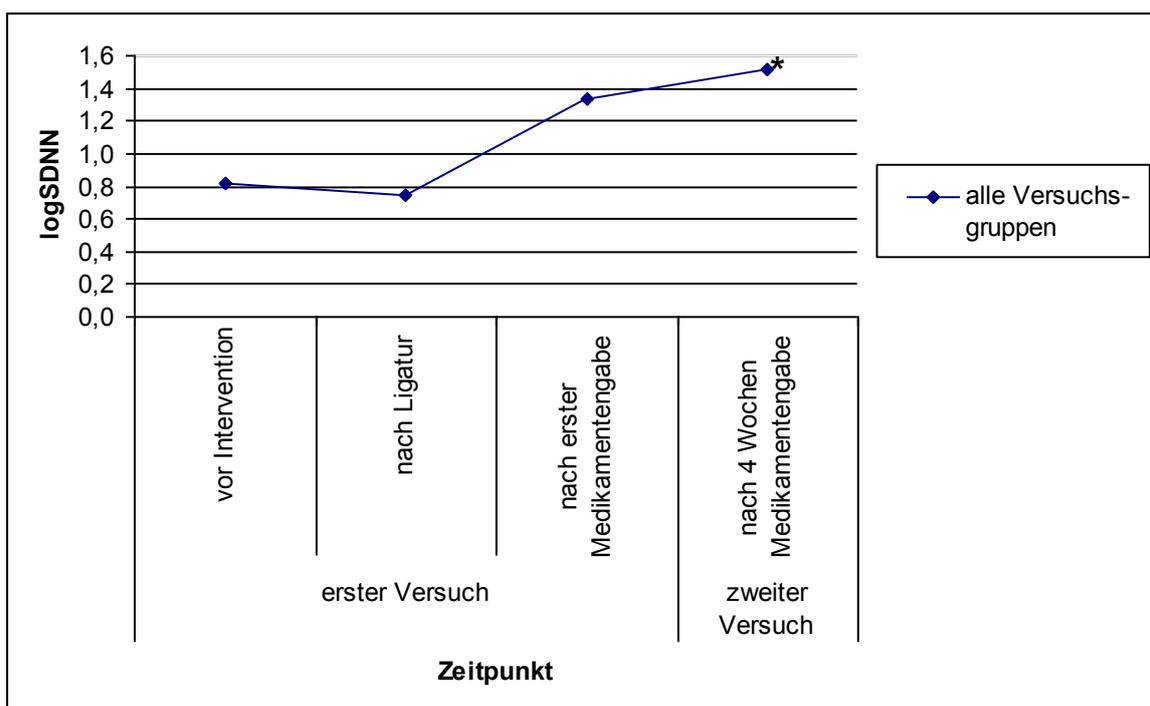
Nach schrittweiser Entfernung aller nicht relevanten Variablen aus dem Modell 2 (Rückwärts-Selektion), konnte ein drittes Modell erstellt werden. Dieses war dem Modell 1 ebenfalls unterlegen, denn das AIC beim Modell 3 betrug 336 bei einer logLikelihood von -160, während das AIC von Modell 1 nur 335 und die logLikelihood - 152 betrug. Daher ist das Modell 1 sowohl dem Modell 2 als auch dem Modell 3 vorzuziehen.

Das Modell 1 ergab folgende Gleichung:

$$\log\text{SDNN} = 0,82 - 0,08 \cdot t_2 + 0,51 \cdot t_3 + 0,70 \cdot t_4.$$

Bei der Modellkonstanten (0,82) handelt es sich um den Koeffizienten der unabhängigen Variablen  $t_1$ , welche dem Kontrollzeitpunkt ( $T_1B_0$ ) entspricht. Der Zeitpunkt des Sham-Manövers oder der Ligatur ( $T_1B_1$ ) aller Versuchsgruppen wird durch  $t_2$  gekennzeichnet,  $t_3$  steht für den Zeitpunkt der ersten Medikamentengabe ( $T_1B_2$ ) aller Versuchsgruppen und  $t_4$  für den letzten Messzeitpunkt nach vierwöchiger Therapie ( $T_2B_3$ ).

Während sich bei allen Therapiegruppen die Zeitpunkte  $t_2$  (Sham-Manöver/Ligatur) und  $t_3$  (erste Medikamentengabe) nicht vom Kontrollzeitpunkt unterschieden, ergab sich ein signifikanter Unterschied ( $p=0.0013$ ) aller Therapiegruppen zwischen dem Zeitpunkt des 2. Versuches nach vierwöchiger Therapiegabe ( $T_2B_3$ ) und dem Kontrollzeitpunkt  $T_1B_0$  (Abb. 23). Der logSDNN sank von 0,82 (Kontrollzeitpunkt) auf 0,74 zum Zeitpunkt des Sham-Manövers oder der Ligatur. Danach kam es nach erster Medikamentengabe in allen Gruppen zu einem Anstieg auf 1,33. Nach vierwöchiger Therapie kam es zu einem weiteren Anstieg des logSDNN auf 1,52, der sich signifikant vom Kontrollzeitpunkt unterschied. Eine Spezifizierung innerhalb der Therapiegruppen war nicht möglich. Die individuelle Streuung des logSDNN der einzelnen Kaninchen über die Zeit war zum Kontrollzeitpunkt 0,77, zum Zeitpunkt des Sham-Manövers oder der Ligatur 0,82, nach erster Medikamentengabe 1,41 und beim letzten Messzeitpunkt nach 4-wöchiger Therapie 1,27 (Anhang 2).



**Abb. 23:** logSDNN im Modell 1 (Mixed-effects-Modell)  
 \* Signifikanter Unterschied ( $p=0.0013$ ) aller Therapiegruppen zwischen dem Zeitpunkt des 2. Versuches nach vierwöchiger Therapiegabe ( $T_2B_3$ ) und dem Kontrollzeitpunkt  $T_1B_0$

Zusammenfassend ergeben sich nach Analyse durch das Mixed-effects-Modell für logSDNN keine signifikanten Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen. Der letzte Messzeitpunkt aller Versuchsgruppen war aber signifikant vom Kontrollzeitpunkt der Versuchsgruppen verschieden. Bei der Analyse der HF mit dem Mixed-effects-Modell wurden sowohl signifikante Unterschiede für die verschiedenen Zeitpunkte in Relation zum Kontrollzeitpunkt (letzter Messzeitpunkt  $T_2B_3$  unterscheidet sich signifikant vom Kontrollzeitpunkt) als auch signifikante Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen (Zeitpunkt Sham-Manöver/Ligatur: Sham-Gruppe zu den Ligaturgruppen; Zeitpunkt erste Medikamentengabe: Iva-Gruppe zu den anderen Therapiegruppen) gefunden.



## 4 Diskussion

Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden nur wenige vergleichende Versuche mit Ivabradin und Metoprolol an Kaninchen durchgeführt, um Veränderungen der Herzfrequenz, der Herzfrequenzvariabilität und der systolischen Funktion nach einem experimentellen Infarkt zu untersuchen. Daher erfolgt der Vergleich der Ergebnisse in einigen Bereichen mit anderen Tiermodellen und mit Patientenstudien, oder es wird auf Studien mit anderen  $\beta$ -Blockern zurückgegriffen.

### 4.1 Herzfrequenz

Durch zahlreiche Studien belegt [DiFrancesco und Camm, 2004; Guth et al., 1987; Schulz, 2006; Singh, 2002; Vilaine et al., 2003], wirkt sich eine Herzfrequenzreduktion positiv auf verschiedene Formen der ischämischen Herzerkrankungen aus, einschließlich der chronisch stabilen Angina pectoris, des akuten Koronarsyndroms und der Herzinsuffizienz. Die Reduktion der Herzfrequenz führt dabei zur Senkung des myokardialen Sauerstoffbedarfs und zur Verlängerung der Diastole, wodurch die myokardiale Durchblutung vor allem des Endokards verbessert wird.

#### 4.1.1 Betablocker

In der vorliegenden Studie sollte gezeigt werden, dass nach Herzinfarkt der kardioselektive  $\beta$ -Blocker Metoprolol eine kardioprotektive Wirkung im Sinne einer Herzfrequenzsenkung und eine Verminderung der Kontraktionskraft bewirkt. Die einmalige i.v. Gabe von 0,25 mg/kg Metoprolol im Anschluss an einen experimentellen Herzinfarkt führte allerdings zu keiner signifikanten Verminderung der Herzfrequenz. Nach darauf folgender 4-wöchiger Therapie mit Metoprolol (0,25 mg/kg p.o.) war eine signifikante Verminderung der Herzfrequenz zu verzeichnen. Da diese Herzfrequenzreduktion in allen 4 Versuchsgruppen vorlag, lässt sie sich nicht spezifisch auf die Gabe des  $\beta$ -Blockers zurückführen.

Eine mögliche Erklärung für das Fehlen der negativen Chronotropie könnte die Dosierung des  $\beta$ -Blockers liefern. In einer Studie von Bel et al. [1998] verursachte die Gabe von Esmolol ( $3 \cdot 10^{-4}$  mol/l oder  $6 \cdot 10^{-3}$  mol/l) keine signifikante Herzfrequenzreduktion. In anderen Studien konnte aber eine signifikante Herzfrequenzreduktion durch einen  $\beta$ -Blocker erreicht werden. So erzeugten Gao et al. [2000] bei Kaninchen durch Ligatur der linken Koronararterie ebenfalls einen experimentellen akuten Herzinfarkt. Auf eine 45-min

Ischämie folgte eine 4-h Reperfusion. Durch Gabe von 1 mg/kg Bisoprolol i.v. konnte eine signifikante Herzfrequenzreduktion erreicht werden. Auch Feuerstein et al. [1998] zeigten in Studien an Kaninchen, dass die einmalige Gabe von Metoprolol (1,0 mg/kg i.v.) nach induziertem Herzinfarkt zu einer kurzfristigen Herzfrequenzreduktion (18 %) führte. Nach erneuter Gabe von Metoprolol (0,5 mg/kg i.v.) konnte eine dauerhafte Herzfrequenzreduktion erreicht werden. Da es sich hierbei um die vierfach höhere Dosierung und die zweimalige Medikamentengabe im Vergleich zu der vorliegende Studie handelt, kann die fehlende Herzfrequenzreduktion am ehesten durch die zu geringe Dosierung erklärt werden.

Eine weitere Erklärung für das Fehlen der negativen Chronotropie stellt die Verabreichungsform des  $\beta$ -Blockers dar. In dieser Studie schloss sich an die erstmalige i.v.-Gabe von 0,25 mg/kg Metoprolol eine weitere 4-wöchige orale Medikamentenapplikation an. Es stellt sich die Frage, ob durch die orale Gabe eine zu geringe Plasmakonzentration erreicht wurde, oder ob die enterale Resorption nicht ausreichte, um eine signifikante Herzfrequenzreduktion zu erreichen. Generell kann der genetische Polymorphismus der metabolisierenden Enzyme zu einer veränderten Biotransformation führen [Reiter, 2004; Meyer und Zanger, 1997].

Des Weiteren stellt sich die Frage, ob Kaninchen keine geeigneten Versuchstiere für eine  $\beta$ -Blocker-Therapie sind. Diese Erklärung ist aber unwahrscheinlich, da nach Brodde [1989] bei Kaninchen sowohl im Vorhof als auch im Ventrikel eine große Anzahl von  $\beta_1$ -Rezeptoren existiert.

Die ausgebliebene HF-Reduktion ist daher am ehesten auf die verwendete Metoprolol-Dosis zurückzuführen.

#### 4.1.2 $I_f$ -Kanal-Blocker

In zahlreichen Studien an Tieren und am Menschen wurde der positive Aspekt der Herzfrequenzreduktion durch die Gabe von spezifisch bradykarden Substanzen wie z.B. Zatebradin und Ivabradin belegt (Tab. 13).

**Tab. 13:** Senkung der Herzfrequenz durch spezifisch bradykarde Substanzen. Das Ausmaß der Bradykardie ist abhängig von Substanz, Dosierung, Spezies und experimentellem Modell.

Autor	Jahr	Medikament	Dosierung	Spezies	experim. Modell	HF-Reduktion
Gardiner SM	1995	Ivabradin	1 mg/kg	Ratte	Chronisch	33 %
Ryu K	1996	Zatebradin	0,75 mg/kg	Kaninchen	Chronisch	25 %
Thollon C	1997	Ivabradin	1 mg/kg	Schwein	Akut	36 %
Mangin L	1998	Ivabradin	2 mg/kg	Ratte	Akut	29 %
Colin P	2002	Ivabradin	0,25 mg/kg 1 mg/kg	Hund	Chronisch	4 % 20 %
Vilaine J	2003	Ivabradin	5 mg/kg	Schwein	Chronisch	14 %
Hu K	2003	Zatebradin	100 mg/kg	Ratte	Chronisch	20 %
Borer J	2003	Ivabradin	5 / 10 mg*	Mensch	Probanden	11 / 19 %
Tendera M	2003	Ivabradin	0,25 mg/kg	Mensch	Probanden	19 %
DiFrancesco D	2004	Ivabradin	0,2 – 0,3 mg/kg	Mensch	Probanden	17 %
Mulder P	2004	Ivabradin	0,3, 1, 3, 10 mg/kg	Ratte	Akut	2, 6, 10, 15 %
Tardif J-C	2005	Ivabradin	5 / 7,5 mg** 5 / 10 mg*	Mensch	Probanden	13 / 18 % 13 / 18 %
Ulu N	2009	Ivabradin	10 mg/kg	Ratten	Akut Chronisch	17 % 15 %
Tardif J-C	2009	Ivabradin	5 / 10 mg*	Mensch	Probanden	13 %

\*Bei einem Gewicht von 80 kg entspricht diese Dosis 0,06 / 0,125 mg/kg

\*\*Bei einem Gewicht von 80 kg entspricht diese Dosis 0,06 / 0,09 mg/kg.

Bei isolierten atrialen Zellen von Ratten sorgte Ivabradin für eine HF Reduktion von 34 % und an Kaninchenherzen von 24 % [César, 2007]. Die verringerte HF erhöhte das O<sub>2</sub>-Angebot und verbesserte die diastolische myokardiale Perfusion des Gewebes [DiFrancesco, 2006]. Bei Ratten mit einem experimentellen Herzinfarkt sorgte eine Herzfrequenzreduktion sowohl durch Ivabradin als auch durch Metoprolol für eine Erhöhung der kardialen Angiogenese. Dabei war der positive Effekt unabhängig vom Behandlungszeitpunkt nach Herzinfarkt [Ulu et al., 2009]. Des Weiteren zeigte sich an experimentellen Rattenmodellen mit chronischer Herzinsuffizienz, dass die selektive Herzfrequenzreduktion durch Ivabradin sowohl die kardiale Funktion [Mulder et al., 2004], als auch das linksventrikuläre Remodeling [Maczewski und Mackiewicz, 2008], die maximale kardiale Perfusion und die koronare Reserve verbessert sowie den periarteriolen Kollagengehalt verringert [Dedkov et al., 2007]. Dabei wirkt Ivabradin

ohne nennenswerten negativen inotropen oder lusitropen Effekt. Kürzlich wurde durch Drouin et al. [2008] an Mäusen mit einem veränderten Blutfettprofil gezeigt, dass durch Ivabradin die zerebrovaskuläre und die renale endotheliale Dysfunktion verhindert werden konnte.

In der vorliegenden Studie zeigte sich eine signifikante Herzfrequenzreduktion nach einmaliger Gabe von 0,25 mg/kg Ivabradin i.v. im Anschluss an einen experimentellen Infarkt bei Kaninchenherzen. Eine signifikante Herzfrequenzreduktion nach vierwöchiger oraler Ivabradintherapie wurde jedoch im Vergleich mit anderen Therapiegruppen nicht erreicht. Generell wurde aber eine signifikante Herzfrequenzreduktion aller Gruppen in Bezug auf den Kontrollzeitpunkt festgestellt.

Wiederum stellt sich die Frage, ob es durch die orale Gabe von Ivabradin überhaupt zu einer der i.v.-Gabe vergleichbaren Plasmakonzentration kommen kann. In einer Studie an Ratten zeigten Gardiner et al. [1995], dass es keinen Wirkungsunterschied zwischen einer i.v. und einer s.c. Ivabradinapplikation gab. Auch eine orale Verabreichung von Ivabradin (5 mg/kg) bei Schweinen verursachte eine Verringerung der Herzfrequenz in Ruhe um 14 % und unter Belastung sogar um 23 % [Vilaine et al., 2003]. Ebenso führte bei Ratten eine wiederholte orale Gabe von Ivabradin (3 mg/kg) zu einer signifikanten Herzfrequenzreduktion [Vilaine, 2006]. Daher gibt es keinen Grund zu der Annahme, dass die unterschiedliche Applikationsart für die fehlende signifikante Herzfrequenzreduktion in Bezug auf die anderen Versuchsgruppen nach vierwöchiger Therapie verantwortlich gemacht werden kann.

Des Weiteren könnte die Dosierung von Ivabradin eine entscheidende Rolle spielen. An Ratten bewirkte in der Studie von Mulder et al. [2004] eine dreimonatige Ivabradintherapie mit unterschiedlichen Dosierungen eine signifikante Verringerung der HF. Sieben Tage nach Verschluss der linken Koronararterien wurde den Tieren Ivabradin in unterschiedlicher Dosierung (0,3, 1, 3 und 10 mg/kg/Tag) über das Futter verabreicht. Nach drei Monaten sank die HF signifikant um 2 % (0,3 mg/kg), 6 % (1 mg/kg), 10 % (3 mg/kg) und um 15 % (10 mg/kg). Thollon et al. [1997] dahingegen zeigte an 25 narkotisierten Schweinen, dass bei unterschiedlicher Dosierung von Ivabradin die Grenzdosierung für eine signifikante Herzfrequenzverringering bei 0,1 mg/kg lag ( $-15,7 \pm 3,0$  %). Bei steigender Dosierung wurde die Reduktion deutlicher und erfolgte schneller (1 mg/kg:  $-36,8 \pm 4,0$  %). In einer kürzlich veröffentlichten großen Studie [Tardif et al., 2009] an 889 Patienten mit chronisch stabiler Angina pectoris wurde Ivabradin in den ersten zwei Monaten in einer Dosierung von 5 mg und in den anschließenden zwei Monaten in einer Dosierung von 10 mg oral verabreicht. Dies entspricht, bei einem geschätzten Körpergewicht von 80 kg einer Dosierung von 0,06 bzw. 0,125 mg/kg. In Ruhe und auch unter Belastung ergaben

sich sowohl eine dosisabhängige Herzfrequenzreduktion als auch eine Verlängerung der Übungsdauer und ein signifikanter Unterschied im Vergleich mit der Placebogruppe [Tardif et al., 2009]. Unsere Dosierung von 0,25 mg/kg lag demzufolge deutlich oberhalb der hier effektiven Dosierung, so dass die Dosierung vermutlich nicht als Ursache für das Fehlen der signifikanten Herzfrequenzreduktion verantwortlich gemacht werden kann.

#### 4.1.3 Sham-Manöver

Nach dem Sham-Manöver war die HF signifikant vermindert, obwohl am Herzen selbst keine Intervention durchgeführt wurde. Vermutlich handelt es sich bei dieser kleinen Gruppenstärke (n=3) um eine ungewöhnliche Antwort im Rahmen der biologischen Variation. Andererseits könnte die HF-Reduktion das Ergebnis einer Baroreflex-vermittelten Antwort auf die Steigerung des Blutdruckes sein.

#### 4.2 Maximaler linksventrikulärer Druck

Während in dieser Studie in der Sham-Gruppe der maximale linksventrikuläre Druck ( $LVP_{max}$ ) nach Sham-Manöver um 32 % anstieg, ergab sich nach Ligatur in der Beta-Gruppe eine Abnahme des  $LVP_{max}$  auf 86 % des Ausgangswertes. Nach erster Metoprololgabe stieg der  $LVP_{max}$  leicht auf 95 % und nach vierwöchiger Therapie auf 134 % des Ausgangswertes an. In der Ivabradin-Gruppe kam es nach Ligatur zu einem leichten Anstieg des  $LVP_{max}$  auf 102 %, nach Medikamentengabe auf 104 % und nach vierwöchiger Therapie auf 118 % des Ausgangswertes.

##### 4.2.1 Betablocker

Entgegen der gängigen Literatur wurde der negativ inotrope Metoprolol-Effekt nicht nachgewiesen. In der Studie von Guth et al. [1987] zeigte sich bei Hunden mit belastungsinduzierter myokardialer Ischämie nach Atenololgabe (0,3 bis 1 mg/kg) ein Abfall des maximalen linksventrikulären Druckes sowohl während Ruhe als auch während Belastung. In einer Studie an Hunden sank der  $LVP_{max}$  signifikant nach Atenololgabe dosisabhängig (0,25, 0,5 und 1 mg/kg i.v.) sowohl in Ruhe als auch während Belastung [Colin et al., 2002]. Bei Feuerstein et al. [1998] zeigte sich an Kaninchen nach Koronarligatur ein signifikanter Abfall von  $LVP_{max}$ . Nach Metoprololapplikation (1 mg/kg und 1 mg/kg + 0,5 mg/kg 90 min später) kam es zu einem weiteren  $LVP_{max}$ -Abfall. Auch bei dieser Spezies wies der  $\beta$ -Blocker eine deutlich negativ inotrope Wirkung auf. Die Tatsache, dass sich in der vorliegenden Studie die negativ inotrope Wirkung des

$\beta$ -Blockers nicht zeigte, könnte erneut mit der Dosierung zusammenhängen, die bei 0,25 mg/kg und damit im untersten Bereich der oben aufgeführten Studien lag. Nur bei Colin et al. [2002] konnte auch mit dieser Dosierung eine signifikante Veränderung der  $LVP_{max}$  erreicht werden, dies allerdings bei Hunden. Guth et al. [1987] und Feuerstein et al. [1998] verwendeten ebenfalls höhere Dosierungen des  $\beta$ -Blockers, so dass die niedrige Dosierung der Grund für das Ausbleiben der Abnahme des  $LVP_{max}$  sein könnte.

#### 4.2.2 $I_f$ -Kanal-Blocker

In dieser Studie ließen sich keine signifikanten Veränderungen von  $LVP_{max}$  in der Ivabradin-Gruppe feststellen. Da Ivabradin nach der Literatur keine Auswirkungen auf die kardiale Inotropie hat, entspricht dieser Befund den Erwartungen. In der Studie von Colin et al. [2002] zeigte sich, dass die i.v. Gabe von Ivabradin (0,25 mg/kg) bei Hunden ebenfalls keinen Einfluss auf die systolische Funktion hatte. Auch der bei der Arbeit angestiegene  $LVP_{max}$  blieb nach Ivabradin (1 mg/kg) unverändert. Ebenso konnten keine Veränderungen des übungsinduzierten Anstieges des  $LVP_{max}$  bei einer Ivabradindosis von 1 mg/kg i.v. nachgewiesen werden [Colin et al., 2003]. Monnet et al. [2001] und Monnet et al. [2004] beobachteten in ihren Studien an Hunden nach Ivabradingabe i.v. (1 mg/kg über 5 min gefolgt von 0,5 mg/kg/h über 24 h oder über 6 h) keine Anzeichen hämodynamischer Veränderungen im Sinne einer negativen Inotropie.

Letztlich zeigten Simon et al. [1995] und Manz et al. [2003] über die linksventrikuläre Auswurfraction, das Schlagvolumen und den mittleren arteriellen Druck, dass Ivabradin keine negativ inotrope Wirkung besitzt.

#### 4.3 Herzfrequenzvariabilität: logSDNN und RMSSD

In der vorliegenden Studie zeigten sich keine signifikanten Veränderungen des logSDNN zu den Zeitpunkten des Sham-Manövers/der Ligatur und der ersten Medikamentengabe. Beim letzten Messzeitpunkt (nach vierwöchiger Therapie) kam es bei allen Therapiegruppen zusammen zu einem signifikanten Anstieg des logSDNN (1,52) im Vergleich zum Kontrollzeitpunkt (0,82); eine Differenzierung der einzelnen Therapiegruppen war aber nicht möglich. Ebenso konnten bei keiner Gruppe signifikante Veränderungen der RMSSD-Werte in Bezug auf die verschiedenen Zeitpunkte oder in Bezug auf die verschiedenen Therapiegruppen festgestellt werden. Sowohl die Metoprololtherapie als auch die Ivabradintherapie zeigte also die erwünschte Verbesserung der HFV-Maße nicht.

#### 4.3.1 Betablocker

In einigen früheren Studien wurden, ebenso wie in der vorliegenden Studie, keine Auswirkungen einer  $\beta$ -Blocker-Therapie auf die HFV-Maße (SDNN, RMSSD) festgestellt. In der randomisierten Doppel-Blind-Studie von Sanderson et al. [1999] an 51 Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz änderte sich die HFV (24 h-EKG) im Zeit- und im Frequenz-Bereich bei einer Behandlung mit Metoprolol nicht signifikant. Ebenso zeigte sich in der Studie von Adamson et al. [1994] an 30 Hunden nach myokardialem Infarkt keine Verbesserung der HFV nach Atenololgabe (1 mg/kg i.v.). Das galt sowohl in der Hoch-Risiko-Gruppe für das Auftreten von Kammerflimmern als auch in der Niedrig-Risiko-Gruppe. Vor dem Myokardinfarkt war nur in der Niedrig-Risiko-Gruppe eine Erhöhung der HFV nach Atenolol zu verzeichnen. Die Berechnungen der HFV erfolgten auf Basis von 25 min-EKG-Aufzeichnungen.

In anderen Studien wurden dagegen signifikante Effekte einer  $\beta$ -Blocker-Therapie auf die SDNN- oder RMSSD-Werte festgestellt. In der Studie von Sandrone et al. [1994] an 20 Postmyokardinfarkt-Patienten war die HFV (24-h-EKG) nach Gabe von Metoprolol (100 – 150 mg/Tag) am 8. bis 10. Tag der Behandlung sowohl bei dem durchschnittlichen 24-h-Wert der RR-Intervalle als auch bei der 24-h RR-Varianz nach  $\beta$ -Blocker-Therapie signifikant angestiegen. Bei Betrachtung der RR-Intervall-Variabilität stellte sich heraus, dass die  $\beta$ -Blocker-Therapie am Tage effizienter als während der Nacht war. Außerdem kam es unter  $\beta$ -Blocker-Therapie zu einer signifikanten Reduktion der durchschnittlichen 24-h-Werte im Niedrig-Frequenz-Bereich sowie zu einer signifikanten Erhöhung der Hochfrequenzkomponente (= Steigerung des Vagotonus). Diese Verschiebung der Sympatho-Vagalen Balance in Richtung Vagotonus durch  $\beta$ -Blocker-Therapie wirkt der gefährlichen Steigerung des Sympathikotonus mit Gefahr von Herzrhythmusstörungen nach Herzinfarkt entgegen. In der Studie von Niemelä et al. [1994] wurde die Wirkung von Metoprolol (200 mg/Tag) versus Atenolol (100 mg/Tag) versus Placebo (100 mg/Tag) an Probanden mit koronarer Herzerkrankung in Bezug auf die HFV (24-h-EKG) untersucht. Die medikamentelle Therapie erfolgte dreimal zwei Wochen lang. Danach war die RMSSD nach Atenolol um 70 % und nach Metoprolol um 62 % angestiegen, der SDNN-Anstieg betrug 20 % bzw. 16 %. Bei den Placebo-Probanden kam es zu keinen Änderungen. Kürzlich wurde durch Sal'nikov [2009] an wachen Ratten mit chronischer Herzinsuffizienz gezeigt, dass es im Hinblick auf HFV-Änderungen Unterschiede zwischen den  $\beta$ -Blockern gibt. Bisoprolol und Metoprolol verbesserten die HFV weniger umfangreich als andere  $\beta$ -Blocker wie z.B. Atenolol und Pindolol. Die Ratten erhielten nach zweimaliger pleuraler Injektion von Silikonöl zur Simulation der funktionellen Herzüberlastung vom 31. bis zum 100. Tag täglich 10 mg/kg Metoprolol per Magensonde. Zur

Berechnung der Parameter der HFV dienten 4 min-EKG Aufzeichnungen. In allen  $\beta$ -Blocker-Gruppen zeigten sich signifikante Veränderungen der SDNN und RMSSD im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der Anstieg der SDNN- und RMSSD-Werte war nach Behandlung mit Metoprolol schwächer ausgeprägt als nach Behandlung mit Atenolol oder Pindolol.

Bei direktem Vergleich der Ergebnisse der zitierten Studien mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie sollten zahlreiche Punkte bedacht werden, die eine mögliche Erklärung für die fehlenden signifikanten Unterschiede in Bezug auf die SDNN- und RMSSD-Werte nach Metoprololtherapie sein könnten.

Bei den aufgeführten Studien handelt es sich um unterschiedliche Spezies (Ratte, Hund, Mensch im Gegensatz zum Kaninchen). Unterschiede in der Ruhe-Herzfrequenz, der Hämodynamik und in der biochemischen Ausstattung der einzelnen Spezies machen daher einen direkten Vergleich schwer. Außerdem wurden die experimentellen Untersuchungen einerseits an wachen [Adamson et al., 1994; Sal'nikov, 2009; Sandrone et al., 1994] andererseits an narkotisierten Probanden oder Tieren (vorliegende Studie) durchgeführt, so dass die unterschiedliche Hämodynamik einen Vergleich beeinflussen könnte. Des Weiteren dienten verschiedene EKG-Aufzeichnungslängen (2 min-Intervalle (vorliegende Studie), 4 min-Intervalle [Sal'nikov, 2009], 25 min-Intervalle [Sanderson et al., 1999], 24 h-EKG [Niemelä et al., 1994; Sandrone et al., 1994]) als Grundlage für die Berechnung der SDNN- und RMSSD-Werte. Ein weiteres Augenmerk sollte darauf gerichtet sein, zu welchem Zeitpunkt die erste  $\beta$ -Blockergabe nach Myokardinfarkt erfolgte. In der vorliegenden Studie erfolgte sie nach einer Stabilisierungsphase direkt im Anschluss an den Myokardinfarkt, bei Adamson et al. [1994] erst am 5. Tag nach Setzen des Myokardinfarkts. Außerdem wurden in den verschiedenen Studien sowohl unterschiedliche  $\beta$ -Blocker als auch abweichende Dosierungen verwendet. Die eingesetzte Dosierung oder einer oder mehrere der genannten Faktoren könnten dazu beigetragen haben, dass sich die HFV-Maße in der vorliegenden Studie nicht geändert haben.

#### 4.3.2 Ivabradin

In der vorliegenden Studie konnten keine signifikanten Veränderungen der SDNN- und RMSSD-Werte sowohl nach einmaliger Ivabradin-gabe als auch nach vierwöchiger Therapie mit Ivabradin nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stehen nicht im Einklang mit der Literatur.

Mangin et al. [1998] zeigten in ihrer Studie an wachen Ratten, dass es nach Ivabradin-gabe zu einem signifikanten Anstieg von SDNN und RMSSD kam. Während sich die Standardabweichung der NN-Intervalle von 14,2 ms (vor Intervention) auf 25,5 ms (30 min

nach Ivabradin) erhöhte, veränderte sich der RMSSD-Wert von 22,2 ms (vor Intervention) auf 35,1 ms (30 min nach Ivabradin). Die Berechnung der HFV-Parameter erfolgte ähnlich wie in dieser Studie aus 3-min Intervallen. In der Studie von Milliez et al. [2009] erhielten Ratten zwei Monate nach Setzen eines Myokardinfarktes für drei Monate eine orale Ivabradintherapie von täglich 10 mg/kg über das Trinkwasser. Bei gleicher Applikation wurde in der Milliez-Studie also eine 40-mal höhere Dosierung als in dieser Studie verwendet. Es wurden einen Tag vor Beginn der Behandlung als auch einen Tag vor Ende der Behandlung an wachen Tieren 24-h-EKGs aufgezeichnet und daraus die SDNN-Werte bestimmt. Nach dreimonatiger Ivabradintherapie zeigte sich eine signifikante Verbesserung ( $p < 0,05$ ) des SDNN-Wertes der Ivabradin-Gruppe ( $5,0 \pm 1,5$  ms) im Vergleich zur Ligaturgruppe ( $3,9 \pm 0,6$  ms).

Wiederum stellt sich die Frage, warum sich in der vorliegenden Studie keine signifikante Veränderung der SDNN- und RMSSD-Werte zeigten. Ein wichtiger Unterschied zu den genannten Studien ist sicherlich die Tatsache, dass in der vorliegenden Studie die Messungen an narkotisierten Tieren und nicht an wachen Tieren vorgenommen wurden. Aus der Literatur ist bekannt, dass die HFV unter Narkose deutlich vermindert ist [Hardraht, 2003; Warkus, 2008]. Des Weiteren wurden die Berechnungen aus unterschiedlichen Aufzeichnungslängen erstellt. Während in der vorliegenden Studie 2-min Intervalle als Berechnungsgrundlage verwendet wurden, handelt es sich bei Mangin et al. [1998] um 3-min Intervalle und bei Milliez et al. [2009] um 24-h EKG-Aufzeichnungen. Ein weiterer Unterschied zu unserer Studie ist die Dosierung von Ivabradin. Sowohl Mangin et al. [1998] als auch Milliez et al. [2009] haben in ihren Studien eine deutlich höhere Ivabradindosierung verwendet (Mangin: 2 mg/kg; Milliez: 10 mg/kg), während unsere Dosierung bei 0,25 mg/kg lag. Außerdem stellt der Vergleich der unterschiedlichen Spezies eine weitere Schwierigkeit dar. Die Herzfrequenz von Kaninchen liegt bei ungefähr  $220-325 \text{ min}^{-1}$  [Schall, 2005], und die von Ratten ist mit  $300-500 \text{ min}^{-1}$  deutlich höher [Havenaar et al., 1995], so dass die Grundlagen zur Berechnung der HFV-Parameter voneinander abweichen.

#### 4.4 Methodenkritik

Der gesamte Studienablauf mit seiner hohen Invasivität (zwei Operationen und Setzen eines Myokardinfarkts) stellte für die Versuchstiere ein erhebliches Trauma dar und verursachte bei diesen eine hohe Mortalität. Die Mortalität lag bei unseren Versuchen bei 42 %, wobei vor allem zu Beginn der Versuchsreihe höhere Verluste zu verzeichnen waren. Dies hängt einerseits mit Schwierigkeiten bei der Intubation der Kaninchen

zusammen, andererseits mit einer gewissen Lernkurve bei der aufwendigen Instrumentierung. Die Mortalitätsrate ist aber mit der Studie von Milliez et al. [2009] vergleichbar, bei der eine Sterblichkeit von 30 % innerhalb der ersten 48 h nach Myokardinfarkt verzeichnet wurde, und bei der jeden Monat weitere 10 % der Tiere verstarben.

Ein weiterer Aspekt betrifft den Umstand, dass in der vorliegenden, retrospektiven Versuchsreihe die Daten anfänglich per EKG-Schreiber und nicht als Computerdaten aufgezeichnet wurden. Dadurch wurde die Anzahl der auswertbaren Ereignisse reduziert. Die teilweise geringe Fallzahl und die Tatsache, dass auf sehr kurze Intervalllängen bei der Berechnung der HFV-Parameter zurückgegriffen wurde, könnte eine Erklärung dafür sein, dass unserer Resultate mit der gängigen Literatur nicht immer deckungsgleich waren. Besonders in Bezug auf die Auswahl der Variablen der Herzfrequenzvariabilität wäre das Vorhandensein von längeren Aufzeichnungsabschnitten der EKG-Daten wünschenswert. Durch 24 h-Aufzeichnungen wäre es sogar möglich, weitere Parameter des Zeitbereiches oder sogar auch Parameter des Frequenzbereichs zu analysieren, die vor allem im Hinblick auf die Regulation durch das autonome Nervensystem eine größere Aussagekraft besitzen.

Nach der vierwöchigen Therapiephase waren die Herzfrequenzen bei den vier Gruppen nicht signifikant unterschiedlich. Dieser Befund überrascht, da sowohl von Metoprolol als auch von Ivabradin eine negativ chronotrope Wirkung beschrieben ist [Feuerstein et al., 1998; Mulder et al., 2004; Maczewski und Mackiewicz, 2008].

Das Ausbleiben der HF-Reduktion ließe sich am ehesten mit der gewählten Dosierung erklären. Sie war für die beiden Medikamente auf Grund der Angaben aus der Literatur gewählt worden. Guth et al. [1987]: „The dosage of atenolol required to reduce exercise heart rate by at least 40 beats per min was determined (0.3-1.0 mg/kg i.v.)” Simon et al. [1995]: „(...) all dogs received in random order and on separate days either saline (control), propranolol (1mg/kg), or one of the following doses of S 16257: 0.1, 0.3,0.5 and 1 mg/kg.” S 16257 ist die spezifisch bradykarde Substanz Ivabradin. Thollon [1997]: „The effects of the two isomers, (+)-S 16257 and (-)-S 16260, (...). In anesthetized pigs, both isomers (0.03, 0.1, 0.3 and 1 mg/kg i.v.) were equipotent to reduce heart rate.” Feuerstein et al. [1998]: „Carvedilol (1 mg/kg) or metoprolol (1 mg/kg or 1 mg/kg + 0,5 mg/kg 90 min later) was given intravenously 5 min before reperfusion.” Ragueneau et al. [1998]: „Eighteen healthy volunteers participated in three successive study periods: an oral double-blind period with two parallel groups of doses (10 or 20 mg, single and repeated); a 10 mg intravenous bolus open period; and a final control period. The effects of ivabradine (...).” Colin et al. [2002]: „Thereafter, all dogs received in random order saline,

atenolol (0.25, 0.5, or 1 mg/kg) or ivabradine [0.25, 0.5, or 1 mg/kg“. Manz et al. [2003]: „Patients were randomized on an unequal basis to receive ivabradine 0.25 mg/kg (n = 31) or placebo (n = 13) by intravenous infusion.“ Anders als der in der Literatur vorwiegend dargestellten intravenösen Gabe der Medikamente wurde in der vorliegenden Studie eine per os Gabe in entsprechender Höhe vorgenommen.

Es wurde auch die Infarktgröße bestimmt. Bei der Met-Gruppe und bei der Iva-Gruppe waren jeweils die Infarkte kleiner als bei der Pla-Gruppe [Brockert, 2007]. Dieser Befund spricht dafür, dass die gewählten Dosierungen zumindest bei der Infarktbildung therapeutisch wirksam waren.

In der vorliegenden Studie wurden die Daten vier Wochen nach experimentellem Infarkt erhoben. Es gibt in der Literatur keine Angaben, ob dieser Zeitpunkt für die Bestimmung von HFV-Werten optimal ist. Die Länge der Therapiephase war aber gewählt worden, weil nach dieser Zeit zu erwarten war, dass sich die Ventrikelfunktion in Abhängigkeit von der Therapie verbessert oder verschlechtert hatte. Des Weiteren ist bis jetzt kein optimaler Aufzeichnungszeitraum nach Myokardinfarkt bekannt, um zu einer bestmöglichen Risikoeinschätzung zu kommen. Die HFV-Werte bei Menschen nach Infarkt sind gewöhnlich nach drei - sechs Monaten zwar verbessert, liegen aber trotzdem niedriger als in Normalbevölkerung. In den meisten Studien wurden die HFV-Werte in der subakuten Phase aufgenommen oder auch bis zu einem Jahr nach Infarkt, und sie zeigten trotzdem signifikante Assoziationen mit der Mortalität [Kleiger et al., 2005].

#### 4.5 Offene Fragen und Ausblick

Ivabradin ist ein neues therapeutisches Mittel, das die Herzfrequenz auf der Ebene des I<sub>f</sub>-Kanals am Sinusknoten reduziert [Thollon et al., 1994]. Es folgten zahlreiche Studien, die am 25.10.2005 dazu führten, dass Ivabradin auf dem europäischen Markt für die Indikation der chronisch stabilen Angina pectoris zugelassen wurde. Seitdem wurde intensive Forschung in Bezug auf die selektive Herzfrequenzreduktion, die antianginöse und antiischämische Wirkung, die Verlängerung der diastolischen Dauer und damit die Verringerung des myokardialen Sauerstoffverbrauches [Colin et al., 2004], die Verbesserung der myokardialen Angiogenese und Verbesserung der endothelialen Dysfunktion [Ulu et al., 2009] und die Abmilderung der Progression der Atherosklerose [Fox et al., 2009] betrieben. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass Ivabradin zu einer Verbesserung der HFV-Parameter führt [Borer und Heuzey, 2008].

Neuere Studien am Menschen legen nahe, dass eine Kombinationstherapie von Ivabradin mit einem  $\beta$ -Blocker vor allem bei Patienten denkbar wäre, bei denen eine effiziente

Therapiedosis der  $\beta$ -Blocker auf Grund von Nebenwirkungen - extreme Müdigkeit, Depression, Bronchospasmus oder erektile Dysfunktion - nicht erreicht werden kann [Tardif et al., 2009].

Milliez et al. [2009] wiesen kürzlich an Ratten nach, dass eine Ivabradintherapie sogar 2 Monate nach Setzen eines Myokardinfarktes noch sinnvoll ist. Durch die Therapie wurde nicht nur selektiv die HF gesenkt, sondern auch die Schwelle der Erregbarkeit herabgesetzt, ohne das Leitungssystem selber zu schädigen, und eine Verschlechterung der linksventrikulären Dysfunktion verhindert. Außerdem konnte eine merkliche Verminderung der myokardialen Fibrose gezeigt werden, und die Ivabradintherapie sorgte für eine Down-Regulation der kardialen Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)-Transkription. Unter Ivabradintherapie verbesserte sich die Herzfrequenzvariabilität (SDNN-Wert), und es kam zu einer Verschiebung der Balance des autonomen Nervensystems in Richtung Vagotonus. Entsprechend sank die Mortalitätsrate im Vergleich zur Placebogruppe (23 % vs. 50 %).

Weitere Forschung in Bezug auf den Einfluss einer Ivabradintherapie auf die Herzfrequenzvariabilität wäre wünschenswert, da bisher erst eine große Studie am Menschen existiert [Camm et al., 2007]. Diese zeigte, dass eine Ivabradintherapie (7,5 mg oder 10,0 mg 2x/Tag) über 3 Monate bei Patienten mit chronisch stabiler Angina pectoris die HFV signifikant erhöht. Dabei kam es bei beiden Dosierungen zu signifikanten Verbesserungen der SDNN-Werte. Der RMSSD-Wert in der 7,5-mg Gruppe wurde allerdings im Gegensatz zur 10,0-mg Gruppe vermutlich wegen der niedrigen Dosierung nicht signifikant verbessert.

Vermutlich auch aus ethischen Gründen liegen bis heute noch keine klinischen Studien vor, die eine Überdosierung von Ivabradin untersucht haben. In Tierstudien wurde bei hoher Dosierung eine Plateau-Phase erreicht, die bei einer maximalen Herzfrequenzsenkung von 33 % liegt. Gravierende Nebenwirkungen scheinen aber, im Gegensatz zu einer Überdosierung mit  $\beta$ -Blockern, auszubleiben.

Generell kann eine verringerte HFV zur Risikoabschätzung nach Myokardinfarkt und für Herzrhythmusstörungen dienen, und sie gilt als frühes Warnzeichen bei diabetischer Neuropathie [Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology, 1996]. Die Kombination aus Tachykardie und verminderter Herzfrequenzvariabilität können als Parameter zur kardiovaskulären Risikoeinschätzung dienen [Mangin et al., 1998]. Nach einer Meta-Analyse hatten Postmyokardinfarkt-Patienten mit einem SDNN-Wert  $< 70$  ms (24 h-EKG) ein vierfach höheres Risiko in den folgenden 3 Jahren zu versterben gegenüber Patienten mit einem SDNN-Wert  $> 70$  ms [Buccelletti et al., 2009].

Es gibt aber laut Kleiger et al. [2005] viele Grenzen der HFV als Risikostratifizierer nach Myokardinfarkt. Bei Vorhofflimmern, sinoatrialer Dysfunktion oder bei Aufzeichnungen mit mehr als 20 % ektopten Komplexen ist eine Risikostratifizierung über die HFV nicht mehr möglich. Des Weiteren sollten die Aufzeichnungen möglichst lang sein und sowohl den Tages- als auch den Nachtrhythmus einschließen.

Es wird außerdem immer noch darüber diskutiert, welcher HFV-Parameter die größte Aussagekraft besitzt. Sowohl Parameter aus dem Zeitbereich als auch aus dem Frequenzbereich zeigen signifikante Assoziationen mit dem Therapieerfolg bei Patienten, es gibt aber keine Überlegenheit der einen Variable über die andere. Generell besitzt die HFV als eindimensionaler Prädiktor eine geringe Sensitivität und einen geringen positiven prädiktiven Wert, weshalb eine Kombination aus HFV und anderen Risikovariablen wie z.B. Ejektionsfraktion, Baroreflexsensitivität, Spät-Potentiale und ventrikuläre Arrhythmien geeigneter zur Risikoeinschätzung erscheint. Aus diesen Kombinationen können dann Untergruppen definiert werden, die für eine sehr geringe oder eine sehr hohe totale Sterbewahrscheinlichkeit und arrhythmogene Sterbewahrscheinlichkeit stehen. Des Weiteren scheint die Kombination aus HFV und linksventrikulärer Ejektionsfraktion ein brauchbares Werkzeug zur Beurteilung des möglichen Nutzens einer prophylaktischen ICD-Implantation zu sein.

Eine jüngst veröffentlichte Studie unterstreicht, dass das optimale Tiermodell für den Vergleich von HFV-Parametern mit denen des Menschen noch nicht gefunden wurde. Manzo et al. [2009] vergleichen sowohl die Herzfrequenz als auch HFV-Parameter (Tieffrequenz- und Hochfrequenzbereich) von gesunden Hunden, Kaninchen und Kälbern mit denen von gesunden Menschen. Dabei stellte sich heraus, dass die HF von Menschen signifikant niedriger ist als die der Tiere. Beim Vergleich der HFV-Parameter zeigten der Tieffrequenz- und der Hochfrequenzbereich von Hunden und Kälbern vergleichbare Werte wie der von gesunden Menschen. Die HFV-Parameter der Kaninchen lagen jedoch signifikant tiefer als die von Menschen, so dass Kaninchen im Vergleich mit Hunden oder Kälbern als weniger geeignete Spezies gelten. Hunde scheinen die am besten geeignete Spezies im Hinblick auf den Vergleich der HFV-Parameter mit Menschen zu sein, aber ihre zum Menschen physiologischen und strukturellen Unterschiede im kardiovaskulären System könnten hier Grenzen aufweisen. Ethische Gesichtspunkte, die Größe der Tiere und Kosten eines solchen Tiermodelles limitieren weiterhin solche Versuchsmodelle.

Letztlich hat sich das Indikationsspektrum der HFV in den letzten Jahren zunehmend erweitert und eine weitere Einführung als Standardbewertungsmittel in der Klinik wäre wünschenswert, da es sich um ein einfaches, nicht invasives und preiswerteres Verfahren handelt.



## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurde untersucht, ob die neuere spezifisch bradykarde Substanz Ivabradin Vorteile in Bezug auf die Herzfrequenz, den maximalen linksventrikulären Druck und die Herzfrequenzvariabilität gegenüber dem  $\beta$ -Rezeptorenblocker Metoprolol, einem etablierten Postmyokardinfarkt-Medikament, aufweist.

In der Studie wurde an 90 New-Zealand-White Kaninchen in drei von vier Versuchsgruppen intraoperativ durch eine Koronarligatur ein Myokardinfarkt verursacht. Im Anschluss an den Myokardinfarkt erfolgte eine einmalige i.v. Medikamentengabe von Ivabradin (0,25 mg/kg), Metoprolol (0,25 mg/kg) oder von Placebo (NaCl-Lösung). In der anschließenden vierwöchigen Postinfarktphase erhielten die Kaninchen die Medikamente oral in der gleichen Dosierung von jeweils 0,25 mg/kg.

Die einmalige Gabe von Metoprolol veränderte weder die Hämodynamik (HF,  $LVP_{max}$ ) noch die Herzfrequenzvariabilität (SDNN- und RMSSD-Werte) signifikant. Nach einmaliger Gabe von Ivabradin kam es zu einer signifikanten Herzfrequenzreduktion (- 17 %), die sich jedoch während der vierwöchigen oralen Therapie nicht aufrechterhalten ließ. Ein negativ inotroper Effekt von Ivabradin ergab sich erwartungsgemäß nicht. Die Ivabradintherapie hatte auf die Parameter der Herzfrequenzvariabilität ebenfalls keine signifikanten Auswirkungen. Ein wesentlicher Grund für das Ausbleiben der erwarteten HFV-Verbesserung in dieser retrospektiven Studie ist vermutlich auf die niedrige Dosierung und / oder auf die Darreichungsform (p.o.) zurückzuführen.

Ivabradin ist heute als Reservepräparat bei der Behandlung der chronisch stabilen Angina pectoris etabliert. Derzeitige Untersuchungen zielen auf eine Erweiterung des Indikationspektrums. Eine Kombinationstherapie eines  $\beta$ -Blockers mit Ivabradin vor allem bei den Patienten, bei denen eine effiziente Therapiedosis der  $\beta$ -Blocker auf Grund von Nebenwirkungen nicht erreicht werden kann, kann derzeit als aussichtsreichste Option angesehen werden.

Die Parameter der Herzfrequenzvariabilität haben im klinischen Alltag als Standardbewertungsmittel z.B. zur Risikostratifizierung nach Myokardinfarkt noch keinen Einzug gehalten, ihr Indikationsspektrum wird aber kontinuierlich erweitert. Es existiert allerdings keine standardisierte Methodik, und Erkenntnisse aus Tiermodellen sind aufgrund erheblicher Unterschiede zum Menschen nur eingeschränkt verwertbar. Daher ist weitere Forschung auf dem Gebiet der Herzfrequenzvariabilität dringend erforderlich. Zusammen mit anderen tierexperimentellen Untersuchungen bestätigt die vorliegende Arbeit die akute negativ chronotrope Wirkung von Ivabradin, eine Verbesserung der Parameter der Herzfrequenzvariabilität konnte bei Kaninchen jedoch nicht erreicht werden.



## 6 Literaturverzeichnis

Adamson, P. B., M. H. Huang, *et al.* (1994). "Unexpected interaction between beta-adrenergic blockade and heart rate variability before and after myocardial infarction. A longitudinal study in dogs at high and low risk for sudden death." Circulation **90**(2): 976-82.

Akselrod, S., D. Gordon, *et al.* (1981). "Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: a quantitative probe of beat-to-beat cardiovascular control." Science **213**(4504): 220-2.

Altman, P., P. Dittmer, *et al.* (1972-1974). Biology Data Book, Bethesda.

Arznei-Telegramm (2006). "Neues Wirkprinzip: Ivabradin (PROCORALAN) bei chronisch stabiler Angina pectoris; **37**, Februar, S.18/19

Bel, A., L. P. Perrault, *et al.* (1998). "Inhibition of the pacemaker current: a bradycardic therapy for off-pump coronary operations." Ann Thorac Surg **66**(1): 148-52.

Bigger, J. T., Jr., J. L. Fleiss, *et al.* (1992). "Correlations among time and frequency domain measures of heart period variability two weeks after acute myocardial infarction." Am J Cardiol **69**(9): 891-8.

Borer, J. S., K. Fox, *et al.* (2003). "Antianginal and antiischemic effects of ivabradine, an I(f) inhibitor, in stable angina: a randomized, double-blind, multicentered, placebo-controlled trial." Circulation **107**(6): 817-23.

Borer, J. S. und J. Y. Heuzey (2008). "Characterization of the heart rate-lowering action of ivabradine, a selective I(f) current inhibitor." Am J Ther **15**(5): 461-73.

Brockert, M. (2007). "Einfluss von If-Kanalinhhibitoren (Ivabradin) im Vergleich zu beta-Blockern (Metoprolol) auf die kardiale Funktion nach akutem Myokardinfarkt beim Kaninchen." Dissertation der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Brodde, O. J. (1989). "β-adrenoreceptors." Receptor pharmacology and function. M. Williams, R. A. Glennon, P. B. M. W. M. Timmermans und eds. New York, Marcel Dekker: 207-43.

Brown, H. F., D. DiFrancesco, *et al.* (1979). "How does adrenaline accelerate the heart?" Nature **280**(5719): 235-6.

Buccelletti, E., E. Gilardi, *et al.* (2009). "Heart rate variability and myocardial infarction: systematic literature review and metanalysis." Eur Rev Med Pharmacol Sci **13**(4): 299-307.

Bucchi, A., M. Baruscotti, *et al.* (2002). "Current-dependent block of rabbit sino-atrial node I(f) channels by ivabradine." J Gen Physiol **120**(1): 1-13.

Bucchi, A., M. Baruscotti, *et al.* (2007). "Modulation of rate by autonomic agonists in SAN cells involves changes in diastolic depolarization and the pacemaker current." J Mol Cell Cardiol **43**(1): 39-48.

Büter, I. (2006). "Spezifisch bradykarde Substanzen: eine Alternative in der Behandlung der koronaren Herzkrankheit?" Dissertation der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Camm, A. J., L. H. J-Y., *et al.* (2007). "Heart rate variability is significantly increased by ivabradine compared with amlodipine in patients with chronic stable angina: a prospective randomised double-blind controlled study." J Am Coll Cardiol **49**(suppl 1): 23A abstract.

Camm, A. J. und C. P. Lau (2003). "Electrophysiological effects of a single intravenous administration of ivabradine (S 16257) in adult patients with normal baseline electrophysiology." Drugs R D **4**(2): 83-9.

César, L. A. (2007). "I(f) current and heart rate control." Arq Bras Cardiol **88**(4): e99-e102.  
CIBIS-II Investigators and Committees (1999). "The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial." Lancet **353**(9146): 9-13.

Colin, P., B. Ghaleh, *et al.* (2002). "Differential effects of heart rate reduction and beta-blockade on left ventricular relaxation during exercise." Am J Physiol Heart Circ Physiol **282**(2): H672-9.

Colin, P., B. Ghaleh, *et al.* (2004). "Effect of graded heart rate reduction with ivabradine on myocardial oxygen consumption and diastolic time in exercising dogs." J Pharmacol Exp Ther **308**(1): 236-40.

Colin, P., B. Ghaleh, *et al.* (2003). "Contributions of heart rate and contractility to myocardial oxygen balance during exercise." Am J Physiol Heart Circ Physiol **284**(2): H676-82.

Craven, K. B. und W. N. Zagotta (2006). "CNG and HCN channels: two peas, one pod." Annu Rev Physiol **68**: 375-401.

Dedkov, E. I., W. Zheng, *et al.* (2007). "Preservation of coronary reserve by ivabradine-induced reduction in heart rate in infarcted rats is associated with decrease in perivascular collagen." Am J Physiol Heart Circ Physiol **293**(1): H590-8.

DiFrancesco, D. (2006). "Funny channels in the control of cardiac rhythm and mode of action of selective blockers." Pharmacol Res **53**(5): 399-406.

DiFrancesco, D. und J. A. Camm (2004). "Heart rate lowering by specific and selective I(f) current inhibition with ivabradine: a new therapeutic perspective in cardiovascular disease." Drugs **64**(16): 1757-65.

Drouin, A., M. E. Gendron, *et al.* (2008). "Chronic heart rate reduction by ivabradine prevents endothelial dysfunction in dyslipidaemic mice." Br J Pharmacol **154**(4): 749-57.

Fedorov, V. N., E. V. Sal'nikov, *et al.* (2006). "Survival of rats with experimental chronic heart failure depending on pharmacodynamic and pharmacokinetic parameters of angiotensin-converting enzyme inhibitors and beta-adrenoceptor blockers." Bull Exp Biol Med **141**(1): 40-3.

Feuerstein, G., G. L. Liu, *et al.* (1998). "Comparison of metoprolol and carvedilol pharmacology and cardioprotection in rabbit ischemia and reperfusion model." Eur J Pharmacol **351**(3): 341-50.

Fox, K., I. Ford, *et al.* (2009). "Relationship between ivabradine treatment and cardiovascular outcomes in patients with stable coronary artery disease and left ventricular systolic dysfunction with limiting angina: a subgroup analysis of the randomized, controlled BEAUTIFUL trial." Eur Heart J **30**(19): 2337-45.

Gao, F., J. Chen, *et al.* (2000). "Comparison of bisoprolol and carvedilol cardioprotection in a rabbit ischemia and reperfusion model." Eur J Pharmacol **406**(1): 109-16.

Gardiner, S. M., P. A. Kemp, *et al.* (1995). "Acute and chronic cardiac and regional haemodynamic effects of the novel bradycardic agent, S16257, in conscious rats." Br J Pharmacol **115**(4): 579-86.

Gilliam, F. R., 3rd, A. J. Kaplan, *et al.* (2007). "Changes in heart rate variability, quality of life, and activity in cardiac resynchronization therapy patients: results of the HF-HRV registry." Pacing Clin Electrophysiol **30**(1): 56-64.

Guth, B. D., G. Heusch, *et al.* (1987). "Mechanism of beneficial effect of beta-adrenergic blockade on exercise-induced myocardial ischemia in conscious dogs." Circ Res **60**(5): 738-46.

Hardraht, H. (2003) "Bestimmung linearer und nichtlinearer Komponenten der Herzfrequenzvariabilität und der Blutdruckfluktuationen durch sukzessive Denervierung und Isolierung des Rattenherzens und deren pathophysiologische Beeinflussung" Dissertation der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Havenaar, R., J. C. Meijer, *et al.* (1995). Biologie, Zucht und Haltung von Versuchstieren. Grundlagen der Versuchstierkunde. L. S. M. van Zutphen, V. Baumans und A. C. Beyen. Stuttgart, Jena, New York, Gustav Fischer Verlag: 19-69.

Hon, E. H. und S. Lee (1965). "Electronic evaluations of the fetal heart rate patterns preceding fetal death, further observations." Am J Obstet Gynec **87**: 814-26.

Hu, K., A. Naumann, *et al.* (2004). "Heart rate reduction by zatebradine reduces infarct size and mortality but promotes remodeling in rats with experimental myocardial infarction." Am J Physiol Heart Circ Physiol **286**(4): 1281-88

Internet Abb.4: [www.itwm.fraunhofer.de/de/as\\_\\_asprojects\\_\\_af/af/](http://www.itwm.fraunhofer.de/de/as__asprojects__af/af/), Zugriff am 22.01.2010

Jiang, H., Z. Lu, *et al.* (2007). "Effects of metoprolol on sympathetic remodeling and electrical remodeling at infarcted border zone after myocardial infarction in rabbits." Cardiology **108**(3): 176-82.

Karow, T. und R. Lang-Roth (2006). Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie.

Kitney R. und O. E. Rempelman (1980). The Studie of Heart-Rate Variability. Oxford, Clarendon Press.

Kleiger, R. E., J. P. Miller, *et al.* (1987). "Decreased heart rate variability and its association with increased mortality after acute myocardial infarction." Am J Cardiol **59**(4): 256-62.

Kleiger, R. E., P. K. Stein, *et al.* (2005). "Heart rate variability: measurement and clinical utility." Ann Noninvasive Electrocardiol **10**(1): 88-101.

La Rovere, M. T., G. D. Pinna, *et al.* (2001). "Baroreflex sensitivity and heart rate variability in the identification of patients at risk for life-threatening arrhythmias: implications for clinical trials." Circulation **103**(16): 2072-7.

Löllgen, H. (1999). "Herzfrequenzvariabilität." Deutsches Ärzteblatt **96 31-32**(45): A2029-2032.

Maczewski, M. und U. Mackiewicz (2008). "Effect of metoprolol and ivabradine on left ventricular remodelling and Ca<sup>2+</sup> handling in the post-infarction rat heart." Cardiovasc Res **79**(1): 42-51.

Madsen, M., V. Gudnason, *et al.* (2007). "Population-based register of acute myocardial infarction: manual of operations." Eur J Cardiovasc Prev Rehabil **14** Suppl 3: S3-22.

Malik, M. und A. J. Camm (1993). "Heart rate variability: from facts to fancies." J Am Coll Cardiol **22**(2): 566-8.

Mangin, L., B. Swynghedauw, *et al.* (1998). "Relationships between heart rate and heart rate variability: study in conscious rats." J Cardiovasc Pharmacol **32**(4): 601-7.

Mangoni, E., P. Fontanaud, *et al.* (2006). "Relationship between If current inhibition by ivabradine and cardiac pacemaking activity." Eur Heart J **27** (Suppl:380 abstract).

Manz, M., M. Reuter, *et al.* (2003). "A single intravenous dose of ivabradine, a novel I(f) inhibitor, lowers heart rate but does not depress left ventricular function in patients with left ventricular dysfunction." Cardiology **100**(3): 149-55

Manzo, A., Y. Ootaki, *et al.* (2009). "Comparative study of heart rate variability between healthy human subjects and healthy dogs, rabbits and calves." Lab Anim **43**(1): 41-5.

MERIT-HF Study Group (1999). "Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF)." Lancet **353**(9169): 2001-7.

Meyer, U. A. und U. M. Zanger (1997). "Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism." Annu Rev Pharmacol Toxicol **37**: 269-96.

Milliez, P., S. Messaoudi, *et al.* (2009). "Beneficial effects of delayed ivabradine treatment on cardiac anatomical and electrical remodeling in rat severe chronic heart failure." Am J Physiol Heart Circ Physiol **296**(2): H435-41.

Monnet, X., P. Colin, *et al.* (2004). "Heart rate reduction during exercise-induced myocardial ischaemia and stunning." Eur Heart J **25**(7): 579-86.

Monnet, X., B. Ghaleh, *et al.* (2001). "Effects of heart rate reduction with ivabradine on exercise-induced myocardial ischemia and stunning." J Pharmacol Exp Ther **299**(3): 1133-9.

Mulder, P., S. Barbier, *et al.* (2004). "Long-term heart rate reduction induced by the selective I(f) current inhibitor ivabradine improves left ventricular function and intrinsic myocardial structure in congestive heart failure." Circulation **109**(13): 1674-9.

Niemelä, M. J., K. E. Airaksinen, *et al.* (1994). "Effect of beta-blockade on heart rate variability in patients with coronary artery disease." J Am Coll Cardiol **23**(6): 1370-7.

Nogami, Y., B. Takase, *et al.* (2005). "Effect of antiarrhythmic agents on heart rate variability indices after myocardial infarction: comparative experimental study of aprindine and procainamide." Biomed Pharmacother **59** Suppl 1: S169-73.

Pagani, M., F. Lombardi, *et al.* (1986). "Power spectral analysis of heart rate and arterial pressure variabilities as a marker of sympatho-vagal interaction in man and conscious dog." Circ Res **59**(2): 178-93.

Pelzer, M., D. Hafner, *et al.* (1995). "[Minimal interval length for safe determination of brief heart rate variability]." Z Kardiol **84**(12): 986-94.

Reiter, M. J. (2004). "Cardiovascular drug class specificity: beta-blockers." Prog Cardiovasc Dis **47**(1): 11-33.

Ruzyllo, W., I. F. Ford, *et al.* (2004). "Anti-anginal and anti-ischaemic effects of the If current inhibitor ivabradine compared to amlodipine as monotherapies in patients with chronic stable angina. Randomized, controlled, double-blind trial." Eur Heart J **25** (suppl. 138, abstract).

Ruzyllo, W., M. Tendera, *et al.* (2007). "Antianginal efficacy and safety of ivabradine compared with amlodipine in patients with stable effort angina pectoris: a 3-month randomised, double-blind, multicentre, noninferiority trial." Drugs **67**(3): 393-405.

Ryu, K. H., N. Tanaka, *et al.* (1996). "Effects of a sinus node inhibitor on the normal and failing rabbit heart." Basic Res Cardiol **91**(2): 131-9.

Sachs, L. und J. Hedderich (2006). Hypothesentests. Angewandte Statistik, Methodensammlung mit R, Berlin, Heidelberg, New York, Springer Verlag: 337-41.

Sal'nikov, E. V. (2009). "Heart rate variability in rats with experimental chronic heart failure and long-term exposure to beta-adrenoblockers." Bull Exp Biol Med **147**(2): 181-4.

Sanderson, J. E., S. K. Chan, *et al.* (1999). "Beta-blockade in heart failure: a comparison of carvedilol with metoprolol." J Am Coll Cardiol **34**(5): 1522-8.

Sandrone, G., A. Mortara, *et al.* (1994). "Effects of beta blockers (atenolol or metoprolol) on heart rate variability after acute myocardial infarction." Am J Cardiol **74**(4): 340-5.

Saul, J. P., Y. Arai, *et al.* (1988). "Assessment of autonomic regulation in chronic congestive heart failure by heart rate spectral analysis." Am J Cardiol **61**(15): 1292-9.

Schall, H. (2005). Kaninchen. Krankheiten der Heimtiere. K. Gabrisch und P. Zwart. Hannover, Schlütersche Verlagsgesellschaft GmbH & Co.

Schipke, J. D., I. Büter, *et al.* (2006). "Selektive I<sub>f</sub>-Kanal-Hemmung: eine Alternative in der Behandlung der koronaren Herzkrankheit?" Herz **31**(1): 55-74.

Schulz, R. (2006). "Reine Herzfrequenzsenkung durch selektive und spezifische If-Kanal-Hemmung: Möglichkeit zur Behandlung der stabilen Angina." J Kardiol **13**(suppl. A).

Simon, L., B. Ghaleh, *et al.* (1995): "Coronary and hemodynamics effects of S 16257, a new bradycardic agent, in resting and exercising conscious dogs." J Pharmacol Exp Ther **275**(2): 659-66.

Singh, B. N. (2001). "Morbidity and mortality in cardiovascular disorders: impact of reduced heart rate." J Cardiovasc Pharmacol Ther **6**(4): 313-31.

Singh, N. (2002). "Diabetes, heart rate, and mortality." J Cardiovasc Pharmacol Ther **7**(2): 117-29.

Stieber, J. (2008). "Ivabradine: pharmacodynamic aspects of its clinical use." Methods Find Exp Clin Pharmacol **30**(8): 633-41.

Tardif, J. C., I. Ford, *et al.* (2003). "Anti-anginal and anti-ischaemic effects of the I<sub>f</sub> current inhibitor ivabradine versus atenolol in stable angina. A 4-month randomized, double-blind, multicenter trial." Eur Heart J **24**: A186 abstract.

Tardif, J. C., I. Ford, *et al.* (2005). "Efficacy of ivabradine, a new selective I(f) inhibitor, compared with atenolol in patients with chronic stable angina." Eur Heart J **26**(23): 2529-36.

Tardif, J. C., P. Ponikowski, *et al.* (2009). "Efficacy of the I(f) current inhibitor ivabradine in patients with chronic stable angina receiving beta-blocker therapy: a 4-month, randomized, placebo-controlled trial." Eur Heart J **30**(5): 540-8.

Task Force of the European Society of Cardiology und the North American Society of Pacing and Electrophysiology (1996). "Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology." Eur Heart J **17**(3): 354-81.

Tendera, M. (2003). "I<sub>f</sub> inhibition with ivabradine in heart-failure: evidence of clinical benefits." European Society of Cardiology, Heart Failure 2003 together with the Annual Congress of the European Section of the International Society for Heart Research 2003, Strasburg

Tendera, M., J. S. Borer, *et al.* (2009). "Efficacy of I(f) Inhibition with Ivabradine in Different Subpopulations with Stable Angina Pectoris." Cardiology **114**(2): 116-125.

Thollon, C., J. P. Bidouard, *et al.* (1997). "Stereospecific in vitro and in vivo effects of the new sinus node inhibitor (+)-S 16257." Eur J Pharmacol **339**(1): 43-51.

Thollon, C., C. Cambarrat, *et al.* (1994). "Electrophysiological effects of S 16257, a novel sino-atrial node modulator, on rabbit and guinea-pig cardiac preparations: comparison with UL-FS 49." Br J Pharmacol **112**(1): 37-42.

Tsuji, H., F. J. Venditti, Jr., *et al.* (1994). "Reduced heart rate variability and mortality risk in an elderly cohort. The Framingham Heart Study." Circulation **90**(2): 878-83.

Ulu, N., R. H. Henning, *et al.* (2009). "Effects of Ivabradine and Metoprolol on Cardiac Angiogenesis and Endothelial Dysfunction in Rats With Heart Failure." J Cardiovasc Pharmacol.

van Ravenswaaij-Arts, C. M., L. A. Kollee, *et al.* (1993): "Heart rate variability." Ann Intern Med **118**(6): 436-47

Vilaine, J. P. (2006). "The discovery of the selective I(f) current inhibitor ivabradine. A new therapeutic approach to ischemic heart disease." Pharmacol Res **53**(5): 424-34.

Vilaine, J. P., J. P. Bidouard, *et al.* (2003). "Anti-ischemic effects of ivabradine, a selective heart rate-reducing agent, in exercise-induced myocardial ischemia in pigs." J Cardiovasc Pharmacol **42**(5): 688-96.

Warkus, S. (2008). "Über die Herzfrequenzregulation während Inhalationsanästhesie: Bedeutung von Sympathikus und Blutdruckniveau - Eine Studie an wachen und narkotisierten Hunden -" Dissertation der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Wolf, M. M., G. A. Varigos, *et al.* (1978). "Sinus arrhythmia in acute myocardial infarction." Med J Aust **2**(2): 52-3.

Yan, S. H., H. S. Hu, *et al.* (2007). "Effects of prolonged metoprolol treatment on neural remodeling and inducible ventricular arrhythmias after myocardial infarction in rabbits." Int J Cardiol **117**(3): 317-22.

## 7 Anhang

### Anhang 1:

#### Modell 3 (Mixed-effects-Modell) der HF

Linear mixed-effects model fit by maximum likelihood

Data:

AIC	BIC	logLik
1190.410	1241.175	-577.2052

Random effects:

Formula:  $\sim(\text{ZEIT2} + \text{ZEIT3} + \text{ZEIT4}) \mid \text{ID}$

Structure: General positive-definite, Log-Cholesky parametrization

	StdDev	Corr		
(Intercept)	33.38149	(Intr)	ZEIT2	ZEIT3
ZEIT2	16.45870	-0.653		
ZEIT3	20.19451	-0.501	0.389	
ZEIT4	41.89733	-0.545	-0.048	-0.099
Residual	6.93896			

Fixed effects: (DSHFMS)  $\sim \text{ZEIT2} + \text{ZEIT3} + \text{ZEIT4} + \text{ZEIT2:TREAT4} + \text{ZEIT3:TREAT1} + \text{ZEIT4:TREAT3}$

	Value	Std.Error	DF	t-value	p-value
(Intercept)	219.48725	5.912252	64	37.12414	0.0000
ZEIT2	5.52585	3.484992	64	1.58561	0.1178
ZEIT3	-4.70559	7.006184	64	-0.67163	0.5042
ZEIT4	-21.40445	8.040936	64	-2.66194	0.0098
ZEIT2:TREAT4	-19.61762	8.902644	64	-2.20357	0.0312
ZEIT3:TREAT1	-27.70404	8.460655	64	-3.27446	0.0017
ZEIT4:TREAT3	-22.04277	14.683521	64	-1.50119	0.1382

Standardized Within-Group Residuals:

Min	Q1	Med	Q3	Max
-1.03678208	-0.20007178	-0.02259382	0.20219733	1.08927960



## Anhang 2:

### Modell 1 (Mixed-effects-Modell) logSDNN

Linear mixed-effects model fit by maximum likelihood

Data:

AIC	BIC	logLik
334.5317	376.8359	-152.2658

Random effects:

Formula:  $\sim(\text{ZEIT2} + \text{ZEIT3} + \text{ZEIT4}) \mid \text{ID}$

Structure: General positive-definite, Log-Cholesky parametrization

	StdDev	Corr		
(Intercept)	0.7870175	(Intr)	ZEIT2	ZEIT3
ZEIT2	0.8156758	-0.516		
ZEIT3	1.4069040	-0.652	0.644	
ZEIT4	1.2712227	-0.791	0.290	0.210
Residual	0.2690953			

Fixed effects:  $\log(\text{SDNNMS}) \sim \text{ZEIT2} + \text{ZEIT3} + \text{ZEIT4}$

	Value	Std.Error	DF	t-value	p-value
(Intercept)	0.8175270	0.1450819	67	5.634935	0.0000
ZEIT2	-0.0841566	0.1647344	67	-0.510862	0.6111
ZEIT3	0.5057953	0.2755820	67	1.835371	0.0709
ZEIT4	0.7039218	0.2101897	67	3.348983	0.0013

Standardized Within-Group Residuals:

Min	Q1	Med	Q3	Max
-0.74979546	-0.22606453	-0.02654673	0.21206797	1.17643775



