

Aus dem Zentrum für Operative Medizin I
Forschungsgruppe Experimentelle Chirurgie
Universitätsklinikum Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. E. Gams

Myosin-Isoenzyme in postischämischen Herzen

Dissertation

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

vorgelegt von
Agnes Monika Schepan

2006

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

gez.: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. B. Nürnberg
Dekan

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

Korreferent: Prof. Dr. A. Gödecke

Meiner Mutter

Inhaltsverzeichnis	Seite
1 Einleitung	1
2 Hintergrund	4
2.1 Metoprolol	4
2.2 Ivabradin	5
2.3 Kontraktile Proteine	8
2.4 Myosin	10
2.5 BNP	13
3 Material und Methodik	16
3.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen.....	16
3.2 Versuchstiergruppen	16
3.3 Verwendete Substanzen	17
3.3.1 Metoprolol	17
3.3.2 Ivabradin	17
3.4 Erstes Operatives Verfahren	18
3.4.1 Narkose und Einleitung	18
3.4.2 In-situ-Messungen.....	18
3.4.3 Setzen der Myokardischämie	19
3.4.4 Blutgasanalyse.....	20
3.5 Zweites Operatives Verfahren	20
3.5.1 Narkose und Einleitung	20
3.5.2 In-situ-Messung.....	21
3.5.3 Blutgasanalyse.....	22
3.5.4 Isolation der Herzen	22
3.6 Datenregistrierung	22
3.7 BNP-Bestimmung.....	23
3.8 Minigel-Elektrophorese.....	24
3.8.1 Grundlagen der Methode	24
3.8.2 Probenaufbereitung.....	25

3.8.3	Elektrophorese	26
3.8.4	Färben, Entfärben und Auswertung	28
3.9	Infarktgröße	29
3.10	Statistik	29
4	Ergebnisse	31
4.1	In-situ-Messungen	31
4.2	Myosin-Isoenzyme	35
4.2.1	Vergleich der Gruppen	35
4.2.2	Vergleich LV, RV und Septum	39
4.3	BNP-Bestimmung	41
4.4	Infarktgröße	42
4.5	Mortalität	43
5	Diskussion	44
5.1	Hämodynamik	45
5.1.1	Metoprolol	45
5.1.2	Ivabradin	48
5.1.3	Vergleich der Substanzen	52
5.2	Myosin-Isoenzyme	53
5.2.1	Mechanische Faktoren	54
5.2.2	Endogene Faktoren	56
5.2.3	Andere Medikamente	59
5.2.4	Regionale Unterschiede	61
5.3	BNP	62
5.4	Infarktgröße	64
5.5	Mortalität	65
5.6	Kritik der Methode	66
6	Zusammenfassung und Schlussfolgerung	69
7	Literatur	70
8	Abbildungsverzeichnis	88

1 Einleitung

Das Myokard besitzt die Fähigkeit, die Minderfunktion geschädigter Myokardareale (beispielsweise infolge einer Ischämie) teilweise zu kompensieren. Die Veränderungen des Myokards nach einer Ischämie betreffen aktive und passive Aspekte und werden als *Remodelling* bezeichnet. Remodelling findet sich im ischämischen und im nichtischämischen Gewebe und beinhaltet:

- Hypertrophie des intakten Myokards,
- Dilatation des Ventrikels,
- Verschlechterung der ventrikulären Funktion,
- Veränderungen der Myosin-Isoenzyme (= Myosinshift),
- Fibrose des geschädigten Myokards.

Durch die Hypertrophie wird zunächst die Zahl der kontraktilen Elemente erhöht. Da es meist zu einer Vergrößerung des Ventrikelradius kommt, bleibt die Wandspannung anfänglich unverändert. Allerdings kann die Struktur des geschädigten Myokards soweit gestört sein, dass in diesem Bereich die Ventrikelwand infolge des intraventrikulären Druckes nach außen vorgewölbt wird, es kommt zur *Dilatation*.

Können die ungeschädigten Myokardareale durch Hypertrophie und Funktionssteigerung den Funktionsverlust der geschädigten Areale nicht kompensieren, kann eine Herzinsuffizienz, die sich durch Reduktion der Herzleistung bemerkbar macht, entstehen [Swynghedaw B *et al.*, 1989]. Durch die veränderte hämodynamische Situation kommt es zu einer Stimulation des sympathischen Nervensystems, des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und der Freisetzung von natriuretischen Peptiden. Als Auslöser des Remodellings werden mechanische Faktoren, wie Druck- und Volumenbelastung, neurohumorale Faktoren, wie ANP (Atrial Natriuretic Peptide), BNP (Brain Natriuretic Peptide), Katecholamine, Vasopressin, ACE (Angiotensin Converting Enzyme) und genetische Faktoren diskutiert [Sutton MG *et al.*, 2000].

Das Ausmaß des myokardialen Remodellings ist ein wesentlicher Faktor für die Prognose nach einem myokardialen Infarkt und korreliert mit der Mortalität und Morbidität; d.h. es ist im Interesse der Patienten, diesen Vorgang zu limitieren [Levy D *et al.*, 1989; Levy D *et al.*, 1990]. Eine Behandlung mit Medikamenten kann den Prozess des Remodellings beeinflussen. Bei ACE-Hemmern ist dieser Effekt schon lange bekannt, aber auch andere Substanzen wie β -Adrenozeptor-Antagonisten und spezifisch bradykarde Substanzen scheinen einen Einfluss auf die postischämischen Veränderungen des Myokards zu haben. In der Literatur finden sich kontroverse Aussagen. Einige Autoren berichten über eine Zunahme des Remodellings durch den β -Blocker Propranolol [Fishbein MC *et al.*, 1988], andere berichten, dass β -Blocker durch Reduktion der neurohormonalen Effekte Remodelling verhindern können [Waagstein F *et al.*, 1993; The cardiac insufficiency bisoprolol study II (CIBI-II): a randomised trial, 1999; Lowes BD *et al.*, 2002]. Diese widersprüchlichen Aussagen lassen sich eventuell dadurch erklären, dass das Remodelling von der Infarktgröße abzuhängen scheint [Hu K *et al.*, 1998]. Bei spezifisch bradykarden Substanzen wurde ebenfalls ein Einfluss auf das Remodelling nachgewiesen. So führte Zatebradin zu einer Induktion des ventrikulären Remodellings [Hu K *et al.*, 2004]. Ivabradin hingegen, konnte bei Ratten nach einem Myokardinfarkt das Remodelling hemmen und führte so zu einer Besserung der kardialen Funktion [Mulder P *et al.*, 2004].

Ein wichtiger Aspekt der Therapie der ischämischen Herzerkrankungen ist die Wiederherstellung des Gleichgewichtes zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffverbrauch. Größen, die den myokardialen Sauerstoffverbrauch beeinflussen sind der kontraktile Status, die Wandspannung und die Herzfrequenz [Quyyumi AA *et al.*, 1993, Granetzny A *et al.*, 1998]. Eine Abnahme der Herzfrequenz führt nicht nur zu einem niedrigeren Sauerstoffbedarf sondern auch zu einer verbesserten subendo-

kardialen Blutversorgung. Alle Substanzen, die zu einer Reduktion der Herzfrequenz führen, scheinen prinzipiell für die Behandlung ischämischer Herzerkrankungen geeignet zu sein. Durch ihren negativ chronotropen Effekt gehören β -Blocker zur Standardtherapie dieser Erkrankungen. Sie haben allerdings auch negative Begleiteffekte, wie die negative Inotropie und die paradoxe Vasokonstriktion der Koronargefäße. Eine Alternative könnten die spezifisch bradykarde Substanzen darstellen, da sie nur relativ geringe kardiovaskuläre Nebenwirkungen haben.

In der vorliegenden Studie an insgesamt 44 Kaninchen wurden die Eigenschaften des β -Blockers Metoprolol und der spezifisch bradykarden Substanz Iva-bradin in einem Modell eines chronischen Myokardinfarktes untersucht. Die Ergebnisse wurden mit einer Sham-Gruppe und einer Placebo-Gruppe verglichen. Ziel dieser Studie war es, unterschiedliche Wirkungen auf die Funktion des Herzens und insbesondere auf die Veränderung der Myosin-Isoenzyme aufzuzeigen.

2 Hintergrund

2.1 Metoprolol

Metoprolol ist ein β -Adrenozeptor-Antagonist mit überwiegend β_1 -blockierender Wirkung (kardioselektiv). Er hemmt kompetitiv den β -Rezeptor und verhindert so die Wirkung endogener oder exogener adrenerger Substanzen. In vivo wirken β -Blocker negativ chronotrop, negativ dromotrop, negativ inotrop und negativ lusitrop. Des Weiteren unterdrücken sie die Automatie der Herzmuskulatur, das bedeutet, dass die Erregbarkeit der Herzmuskulatur verringert ist und so weniger Arrhythmien durch ektope Erregungsbildung entstehen können. Die Wirkung ist umso stärker, je höher der Sympathikotonus ist.

Das Herz pumpt gegen den Druck, der in der Aorta herrscht, Blut in die Körperperipherie. Ist dieser Druck erhöht, kommt es zur Druckbelastung (Nachlast) des Herzens. Um das gleiche Schlagvolumen gegen den Aortendruck auswerfen zu können, wird die Wandspannung erhöht. Für diese sogenannte Druckerarbeit wird mehr Sauerstoff benötigt. Eine Senkung des Aortendrucks verringert die Wandspannung des Ventrikels ist dadurch energetisch günstiger. Der daraus resultierende verminderte Sauerstoffbedarf, führt zu einer Besserung der Versorgung des Myokards. Eine Reduktion des Schlagvolumens und der Herzfrequenz verringert das Herzzeitvolumen und senkt den Aorten- bzw. Blutdruck. Die Abnahme der Herzfrequenz verlängert zusätzlich die Diastolendauer, wodurch das Zeitintervall, in dem O_2 an das Myokard abgegeben werden kann, verlängert wird.

Als Nebenwirkungen kann es durch β -Blocker neben der Bradykardie und Abnahme der Kontraktilität, zu Bronchokonstriktionen und zentralnervösen Effekten kommen. Indiziert sind diese Substanzen zur Therapie der koronaren Herzkrankheit, des arte-

riellen Hypertonus, des akuten Myokardinfarkts, der Herzrhythmusstörungen und in der Behandlung einer Herzinsuffizienz.

In der Behandlung des Myokardinfarkts sind β -Blocker schon lange fester Bestandteil der Therapie. Studien haben gezeigt, dass die Morbidität und die Mortalität nach einem Infarkt mit Hilfe von β -Blockern signifikant gesenkt werden konnte [Hjalmarson A *et al.*, 1981; MIAMI Trial Research Group, 1985]. Ebenso konnte das Risiko eines Reinfarkts signifikant gesenkt werden. Dabei ist vor allem die Reduktion der Herzfrequenz in der Therapie des Myokardinfarkts von zentraler Bedeutung [Indolfi C *et al.*, 1993], da dadurch der myokardiale Energiehaushalt gebessert wird.

Auch in der Behandlung der Herzinsuffizienz spielen β -Blocker eine große Rolle und führen zu einer deutlichen Verbesserung der hämodynamischen Situation [Australia-New Zealand Heart Failure Research Collaborative Group, 1995; Olsen SL *et al.*, 1995; Lechat P *et al.*, 1998] und senken damit die Letalität. Bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz kommt es infolge der dauernden sympathischen Stimulation zu einer Downregulation der β -Rezeptoren. β -Blocker schützen das Myokard vor dieser erhöhten Sympathikusaktivität und führen zu einer Zunahme der β -Rezeptoren, woraus eine Zunahme der Kontraktionskraft resultiert.

Es bleibt festzuhalten, dass β -Blocker wegen ihrer negativ inotropen Wirkung die Funktion von ischämisch geschädigtem Myokard weiter verschlechtern, und dass es zur Toleranzentwicklung kommen kann.

2.2 Ivabradin

Ivabradin gehört zu der neueren Wirkstoffgruppe der spezifisch bradykarden Substanzen. Diese Substanzgruppe ist eine Weiterentwicklung der Ca^{2+} -Antagonisten vom Verapamiltyp. Ivabradin hemmt nicht wie ein Betablocker die Sympathikus-

aktivität, sondern bindet an die I_f -Kanäle im Sinusknoten. Die Kanäle sind durchlässig für Natrium, Kalium und Kalzium und bewirken die spontane Depolarisation. Wegen ihrer Unspezifität werden sie auch als 'funny channel' bezeichnet. Werden diese Kanäle gehemmt, verlangsamt sich die Depolarisation und die Herzfrequenz sinkt [Thollon C *et al.*, 1994] (Abb. 1).

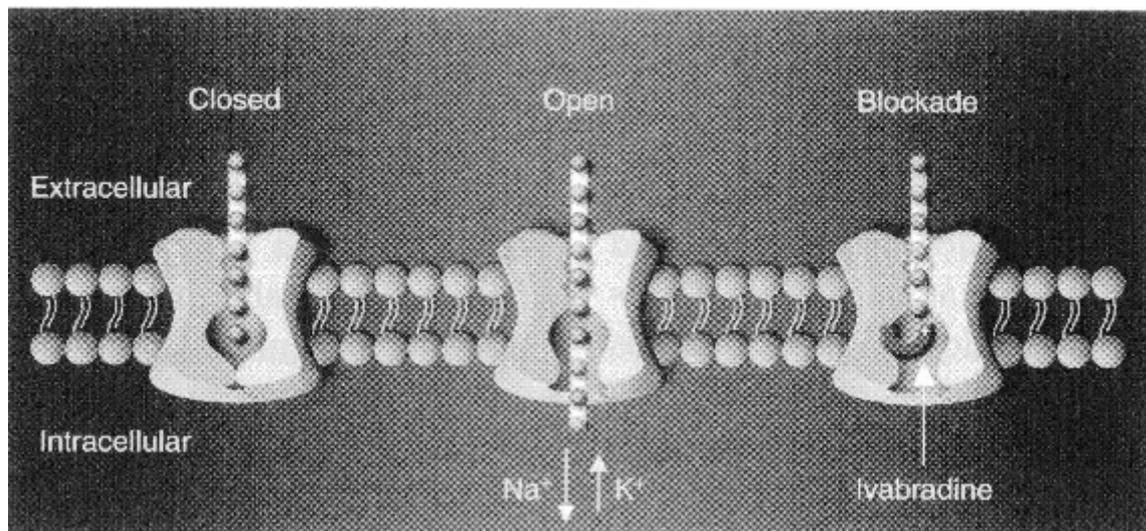


Abb.1: Schematische Darstellung des I_f -Kanals. Ivabradin blockiert diesen Kanal und unterbindet so die Ionenströme [DiFrancesco *et al.*, 2000]

Es sind vier verschiedene Isoformen des Kanals bekannt. Sie gehören zu der Familie der HCN-Kanäle (hyperpolarisation-activated, cyclic nucleotide-gated) und werden als HCN1 bis HCN4 bezeichnet. Bei den I_f -Kanälen in den sinuatrialen Zellen handelt es sich um die Isoformen HCN1 und HCN4 [Rosen MR *et al.*, 2001].

Im Vergleich zu β -Blockern scheint Ivabradin einige Vorteile zu haben. Es sind keine direkten negativ inotropen Effekte, kein Rebound-Phänomen, keine Vasokonstriktion der Koronargefäße und keine Toleranzentwicklung bekannt [Borer S *et al.*, 2003]. Ein weiterer Vorteil scheint die fehlende Aktivierung des autonomen Nervensystems zu sein.

Studien zu Ivabradin haben antiangiale und antiischämische Effekte bei Patienten mit stabiler Angina pectoris gezeigt. Daraus resultierend hat die Europäische Arzneimittelbehörde im September 2005 eine Empfehlung zur Zulassung des neuen Wirkstoffes gegeben, und zwar zur Behandlung von Patienten mit chronisch stabiler Angina pectoris mit normalem Sinus-Rhythmus, bei denen eine Kontraindikation oder Intoleranz für β -Blocker besteht. Auch wenn die protektive Rolle der β -Blocker in der Infarkttherapie gut untersucht ist, so gibt es auch eine Studie mit dem β -Blocker Metoprolol die sogar ein erhöhtes Risiko zur Entstehung eines kardiogenen Schocks zeigte. Auch konnte keine Verbesserung der Morbidität und Mortalität nach einem akuten Myokardinfarkt gezeigt werden [Collins R, 2005].

Auch in der perioperativen Phase sollen spezifisch bradykarde Substanzen bei Patienten mit Herzerkrankungen Vorteile haben. Bei Patienten, die sich einem herzchirurgischen Eingriff unterzogen, konnten perioperative Infarkte reduziert werden [Skaraven *et al.*, 1987]. Dieser Effekt darf auch auf die negative Chronotropie zurückgeführt werden. Ivabradin konnte in einigen Studien die Mortalität nach einem Myokardinfarkt und die Infarktgröße senken [Hu K *et al.*, 2004]. In der Behandlung der Herzinsuffizienz könnten spezifisch bradykarde Substanzen ebenfalls von Bedeutung sein. So zeigte eine Studie an Patienten mit linksventrikulärer Dysfunktion durch Reduktion der Herzfrequenz eine Verbesserung der mechanischen Effizienz [Shinke T *et al.*, 1999]. Da sich I_f -Kanäle auch in der Retina finden kommt es als Nebenwirkung des Ivabradins zu Sehstörungen. Die Patienten klagen über Blitzlichter, Doppel und Nachbilder (= Phospene; Demontis *et al.*, 2002).

Eine Therapie mit dieser Substanz könnte eine Alternative zur Therapie mit β -Blockern darstellen. Auch wenn β -Blocker zur Zeit Mittel der Wahl sind, so sind sie nicht für alle Patienten geeignet. Kontraindikationen einer β -Blocker-Therapie sind z.B. vaskuläre Erkrankungen, Hypotension, AV-Block 1. Grades oder obstruktive

Lungenerkrankungen. Weiterhin führen sie zu einer Abnahme der kardialen Kontraktilität und können eine paradoxe Vasokonstriktion der epikardialen Gefäße induzieren [Bortone AS *et al.*, 1990]. Bei diesen Patienten könnte in der Zukunft eine Therapie mit Substanzen wie Ivabradin indiziert sein. Ergebnisse von tierexperimentellen Studien und klinischen Untersuchungen, potentielle Anwendungen und offene Fragen wurden kürzlich in einer Übersichtsarbeit zusammengestellt [Schipke *et al.*, Herz 2006].

2.3 Kontraktile Proteine

Bei der Kontraktion der Herzmuskulatur spielen sechs verschiedene Proteine eine Rolle: Myosin, Aktin, Tropomyosin, Troponin C, Troponin I und Troponin T. Myosin und Aktin bilden die Filamente des kontraktiven Apparates. Die Interaktion der kontraktiven Filamente verkürzt die Muskulatur. Dabei bilden sich sogenannte Querbrücken zwischen dem Myosinköpfchen und dem Aktinfilament aus. Durch Kippen des Köpfchens gleiten die Filamente übereinander – der Muskel kontrahiert. Die Bindung wird gelöst, indem sich ATP an den Myosinkopf anlagert. Fehlt ATP im Zytosol, so verharrt der Myosinkopf in seiner gebundenen Stellung und der Querbrückenzyklus kommt zum Stillstand.

Tropomyosin und Troponin sind Regulatorproteine, die die Kontraktion der Muskulatur steuern. Tropomyosin ist ein fadenförmiges Protein, mit einem Gewicht von 67 kDa. Troponin besteht aus drei Untereinheiten: *Troponin I*, das an Aktin bindet und die Aktin-Myosin-Interaktion inhibiert; *Troponin C*, das Ca^{2+} bindet und *Troponin T*, das eine Verbindung zu Tropomyosin herstellt [Katz AM, 1992] (Abb. 2).

Aktin bildet die dünnen Filamente des kontraktiven Apparats. Es handelt sich um ein globuläres Molekül mit einem Gewicht von 42 kDa. Es hat zwei Funktionen:

2.4 Myosin

Myosin ist ein Hexamer, das aus zwei schweren Ketten (MHC) und vier leichten Ketten (MLC) besteht. Das Gewicht liegt bei ca. 480 kDa, wobei die schweren Ketten jeweils ca. 220 kDa wiegen. Bei den schweren Ketten handelt es sich um zwei ineinander verdrillte Eiweißketten, die am Ende zu globulären Köpfchen verdickt sind. Aufbau des Myosinmoleküls (Abb. 4):

- 2 x Myosinkopf (Länge 20 nm)
- Myosinhals (Länge 45 nm)
- Myosinschaft (Länge 110 nm)

Im Übergangsbereich von Hals- und Kopfreion sind vier regulatorische leichte Myosinketten angelagert (je ca. 20 kDa):

- 2 x ELC (essential light chain)
- 2 x RLC (regulatory light chain)

An den Köpfchen befinden sich zwei Bindungsstellen:

- für Aktin (Entstehung von Aktomyosin);
- für ATP (der Myosinkopf hat eine ATPase-Aktivität).

Über die erste Bindungsstelle bildet der Kopf die für die Muskelkontraktion wichtigen Querbrücken zum Aktinfilament aus.

Ein Myosinfilament hat einen Durchmesser von 10-15 nm und eine Länge von 1,5-1,6 Mikrometer. Es besteht aus 200 – 300 aneinander gelagerten Schaftregionen und an seinen Enden ragen die Myosinköpfe „Flaschenbürstenartig“ hervor.

Es sind drei verschiedene Isoformen (V₁-3) des Myosins bekannt. Wie bereits erwähnt, besteht Myosin u.a. aus zwei miteinander verdrillten schweren Ketten – die sogenannten α - und β -Ketten. Die Isoformen unterscheiden sich in der Struktur ihrer schweren Ketten. V₁ besteht aus zwei α -Ketten ($\alpha\alpha$), V₂ aus einer α -Kette und einer β -Kette ($\alpha\beta$) und V₃ aus zwei β -Ketten ($\beta\beta$) [Hoh JFY *et al.*, 1997]. Funktionelle Un-

terschiede finden sich in der ATPase-Aktivität, und somit im Energieverbrauch und in der Kontraktionsgeschwindigkeit. V_1 hat eine hohe ATPase-Aktivität, V_3 hingegen eine niedrige. Es arbeitet somit ökonomischer als V_1 . V_2 liegt dazwischen [Pope B *et al.*, 1980; Alpert NA *et al.*, 1979; Lompre AM *et al.*, 1979; Schwartz K *et al.*, 1981; Alpert NR *et al.*, 1980]. Die Kontraktionsgeschwindigkeit von V_1 ist zwei- bis dreimal höher als die von V_3 [Alpert NA *et al.*, 2002]. Je nach Spezies und deren Lebensbedingungen unterscheidet sich die Zusammensetzung des Myosins. In kleinen Spezies, wie Ratten und Mäusen, dominiert V_1 , in größeren, wie dem Kaninchen oder dem Menschen, dominiert V_3 im linken Ventrikel. V_1 findet sich bei den großen Spezies vornehmlich im Atrium. Da beim adulten Kaninchen ebenfalls V_3 dominiert, scheint es sinnvoll zu sein, Untersuchungen an dieser Spezies durchzuführen.

Die Zusammensetzung der Myosin-Isoenzyme ist ebenfalls altersabhängig. Beim neugeborenen und juvenilen Kaninchen dominiert V_1 , das mit einer schnelleren Kontraktion und einer höheren Herzfrequenz korreliert. Wenn die Tiere älter werden, verändert sich das Verhältnis der Isoenzyme zueinander. Im erwachsenen Kaninchen dominiert V_3 , das mit einer langsameren Herzfrequenz einhergeht [Litten RZ *et al.*, 1985]. Studien haben gezeigt, dass bei der Entwicklung von kardialen Erkrankungen, die mit einer erhöhten Druck- oder Volumenbelastung einhergehen, V_1 down-reguliert ist. Es kommt zu einem Myosinshift in Richtung V_3 . Das prozentuale Verhältnis der Isoformen zueinander ist für die ventrikuläre Funktion von Bedeutung. Eine Verschiebung in Richtung V_3 wird als kompensatorischer Mechanismus angesehen, da sie die myokardiale Effizienz steigert. V_3 hat eine geringere ATPase-Aktivität, wodurch die Aktin-Myosin-Filamente langsamer übereinander gleiten; d.h. der Energieverbrauch wird gesenkt, allerdings zu Lasten der Kontraktionskraft [Krenz M *et al.*, 2004]. Entsprechend verbessert eine Up-Regulation von V_1 die Kontraktionskraft, einhergehend mit einem erhöhten Energieverbrauch [Abraham WT *et al.*, 2002]. Da-

bei ist vor allem die Leistungskraft des Herzens von der Expression der Myosin-Isoformen abhängig. Eine Zunahme von V_1 führt zu einer Steigerung der Leistungskraft und somit zu einer Verbesserung der ventrikulären systolischen Funktion [Korte FS *et al.*, 2005]. Früher nahm man an, dass in humanem Myokard fast ausschließlich V_3 zu finden ist, daher schienen Untersuchungen des Myosinshifts irrelevant zu sein. Mittlerweile haben einigen Untersuchungen erhebliche Anteile von V_1 (30 % bzw. 23-34 %) gefunden, die bei herzinsuffizienten Patienten nicht mehr nachzuweisen sind [Miyata S *et al.*, 2000; Lowes B *et al.*, 1997]. Der Myosinshift und dessen Auswirkungen auf die ventrikuläre Funktion spielt also auch beim Menschen eine wesentliche Rolle.

Der Myosinshift kann durch verschiedene Medikamente moduliert werden. So führen ACE-Hemmer, Angiotensin-II-Rezeptorantagonisten oder Erythropoetin nach Myokardinfarkt zu einer erhöhten V_1 -Expression [Wang J *et al.*, 2002; van der Meer P *et al.*, 2005]. Auch β -Blocker beeinflussen die Zusammensetzung der Isoformen [Yasumara Y *et al.*, 2003].

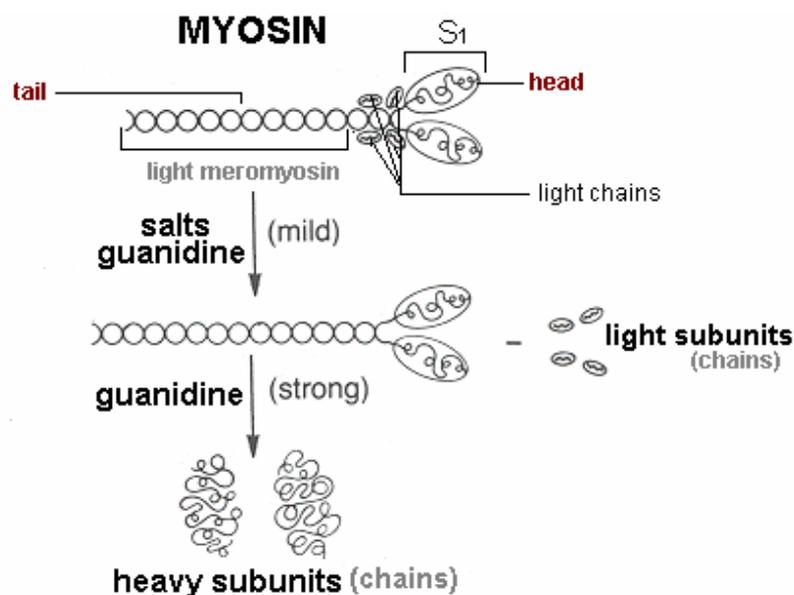


Abb. 4: Myosin besteht aus zwei schweren und vier leichten Ketten. Durch Salze kann das Molekül in seine einzelnen Untereinheiten aufgespaltet werden.

2.5 BNP

Die Familie der natriuretischen Peptide umfasst drei bisher bekannte verschiedene Typen: Atrial Natriuretic Peptide (ANP), Brain Natriuretic Peptide (BNP) und C-type Natriuretic Peptide (CNP). BNP wurde ursprünglich für ZNS-spezifisch gehalten, da es zuerst aus Schweinehirnen isoliert wurde [Sudoh T *et al.*, 1988]. Mittlerweile ist bekannt, dass BNP ebenfalls und sogar in größeren Mengen durch ventrikuläre Myozyten gebildet wird. Es handelt sich um ein aus 32 Aminosäuren bestehendes kardiales Peptid-Hormon, das eine 17 Aminosäuren lange Ringstruktur enthält (Abb. 5).

BNP hat natriuretische, diuretische und vasodilatierende Wirkung. Es kann als Antagonist des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems angesehen werden, senkt die Vor- und Nachlast und entlastet somit das Herz [Davidson NC *et al.*, 1994]. BNP hat zusätzlich einen positiv lusitropen Effekt, wodurch die Relaxation der Ventrikel verbessert und der diastolische Blutdruck gesenkt wird.

Nesiritide ist die rekombinante Form des BNP, die in den USA zur Therapie einer akuten dekompensierten Herzinsuffizienz mit Dyspnoe zugelassen ist. Intravenös verabreicht senkt es den pulmonalvenösen Druck und wird daher vor allem bei Patienten mit einem Lungenödem eingesetzt. Studien haben allerdings gezeigt, dass die Mortalität durch Nesiritide sogar erhöht ist und dass sich keinerlei Vorteile gegenüber der Behandlung mit Nitroglycerin gezeigt haben. Es wird daher nur als Reservepräparat verwendet und der Einsatz ist umstritten [Topol EJ *et al.*, 2005].

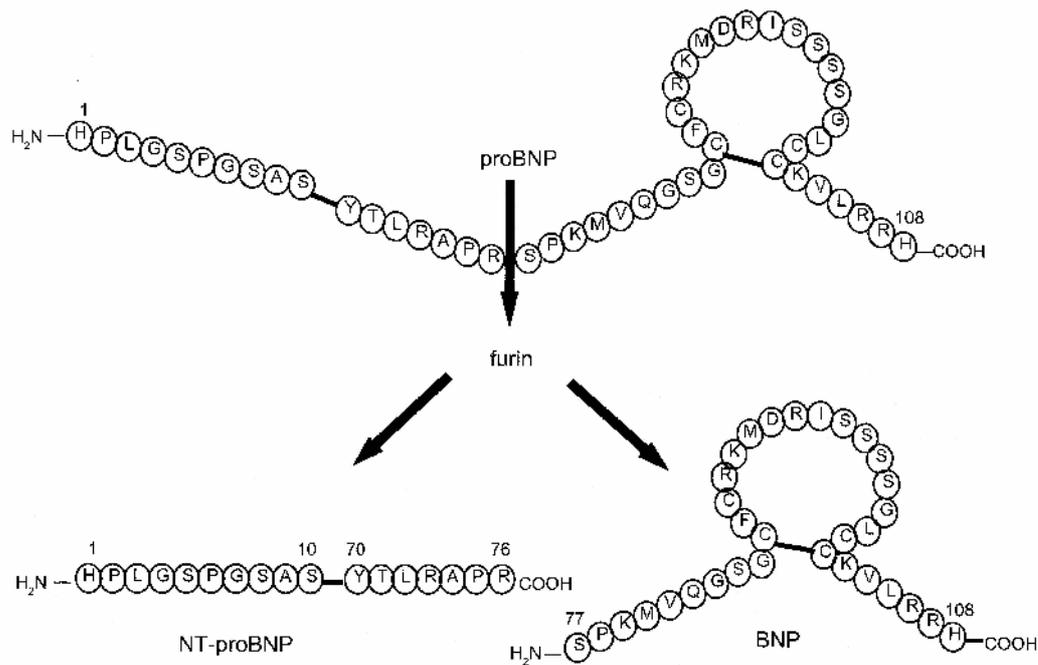


Abb. 5: Schematische Darstellung von proBNP und dessen enzymatische Umwandlung in die biologisch aktiven Formen BNP und NT-proBNP.

BNP ist in der Diagnosestellung und der Therapie der akuten und chronischen Herzinsuffizienz von großer Bedeutung. Als Zeichen einer erhöhten Volumen- und Druckbelastung des Herzens, ist der BNP-Spiegel bei herzinsuffizienten Patienten erhöht. Dieser Anstieg zeigt sich bereits, wenn die Herzinsuffizienz klinisch noch asymptomatisch ist. Aber auch andere Faktoren wie Tachykardie, Glukokortikoide, Schilddrüsenhormone, Endothelin und Angiotensin II erhöhen die Sekretion von BNP. Durch die hämodynamischen Auswirkungen wirkt es dem ventrikulären Remodelling entgegen und vermindert die neurohumorale Aktivierung [de Lemos *et al.*, 2003]. Auch nach einer Myokardischämie kommt es als Zeichen einer ventrikulären Dysfunktion zu einer deutlichen Erhöhung des BNP-Wertes [Hunt PJ *et al.*, 1997]. Daher kann BNP als prognostischer Marker bei Patienten mit instabiler Angina pectoris oder bei Patienten nach einem Myokardinfarkt genutzt werden [Richards AM *et al.*, 2003].

Natriuretische Peptide scheinen Informationen bezüglich der Prognose von Herzerkrankungen zu liefern. Je höher der BNP-Wert desto höher ist die Sterblichkeit und das Risiko für das Auftreten einer Herzinsuffizienz [Freitag MH *et al.*, 2003]. Aber auch für die Diagnosestellung, den Schweregrad der Erkrankung und die Verlaufskontrolle einer Therapie stellt BNP einen geeigneten Parameter dar. Die Plasmakonzentration fällt bei effektiver Therapie mit ACE-Hemmern, Betablockern und Digoxin signifikant ab [Tsutamoto T *et al.*, 1999]. BNP zeigt eine höhere Sensitivität und Spezifität für die diastolische und die systolische Funktion als ANP [Yamamoto K *et al.*, 1996]. Dies ist mitunter ein Grund dafür, dass in den meisten Studien mittlerweile nicht mehr ANP sondern BNP bestimmt wird.

3 Material und Methodik

3.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Die Versuche wurden an Herzen von 44 adulten, männlichen New-Zealand-White Kaninchen durchgeführt. Das Alter der Tiere lag zwischen 15 und 22 Wochen. Das Körpergewicht lag zwischen 2700 und 3720 g. Alle Kaninchen stammten aus einer pathogenfreien Versuchstierzucht 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.

3.2 Versuchstiergruppen

Es wurden vier Versuchsgruppen gebildet. Bei der ersten Gruppe handelte es sich um Sham-Tiere (n=10), bei denen der gleiche chirurgische Eingriff wie bei den anderen Gruppen, aber weder eine Koronarligatur durchgeführt noch ein Medikament verabreicht wurde. Die zweite Gruppe (n=13) erhielt nach einer experimentellen, regionalen Ischämie (durch permanente Ligatur eines Hauptastes der linken Koronararterie) Placebo (NaCl 0,9 %; 0,25 ml/kg). Eine dritte Gruppe (n=10) wurde nach Setzen der Ischämie mit dem β -Blocker Metoprolol (0,25 mg/kg) behandelt. Die letzte und vierte Gruppe (n=11) erhielt nach der Ischämie die spezifisch bradykarde Substanz Ivabradin (0,25 mg/kg). Die Anzahl der Tiere in den vier verschiedenen Gruppen war vor der ersten Operation etwa einheitlich und änderte sich im Laufe des Protokolles (Tab. 1).

Tab. 1: Versuchsreihe mit einer Medikamentendosierung von 0,25 mg/kg. Übersicht über die Anzahl der Versuchstiere, je nach Untersuchung.

	Sham	Placebo	Metoprolol	Ivabradin
1.OP	10	13	10	11
2.OP	7	9	10	9
Myosin	3	4	3	3
BNP	10	13	10	11

3.3 Verwendete Substanzen

3.3.1 Metoprolol

Bei Metoprolol handelt es sich um ein weißes, kristallines Pulver mit der chemischen Bezeichnung: (1-(Isopropylamino)-3-(p-[β-methoxyethyl]phenoxy)-2-propanol). Die Substanz ist wasserlöslich und das Molekulargewicht liegt bei 266 g (Abb. 6).

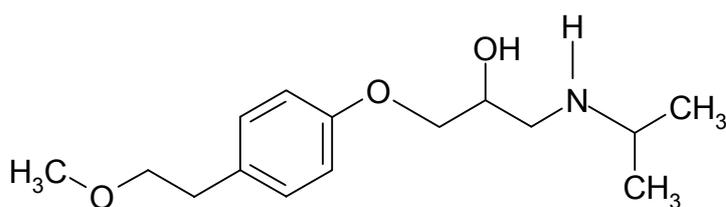


Abb. 6: Strukturformel Metoprolol.

3.3.2 Ivabradin

Ivabradin (S-16257) ist ein weißes, wasserlösliches Pulver mit der chemischen Bezeichnung: (7,8-dimethoxy 3-{3-[(1S)-(4,5-dimethoxybenzocyclo-

butan-1-yl) methyl] methylamino}propyl} 1,3,4,5-tetrahydro-2*H*-benzazepin 2-one).

Die Substanz hat ein Molekulargewicht von 484 g (Abb. 7).

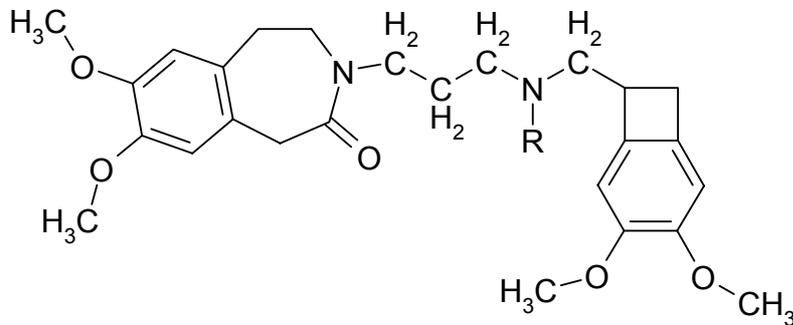


Abb. 7: Strukturformel Ivabradin.

3.4 Erstes Operatives Verfahren

3.4.1 Narkose und Einleitung

Die Kaninchen wurden mit i.m. Ketavet (25 mg/kg) und i.m. Rompun (25 mg/kg) narkotisiert. Anschließend wurde eine Venenverweilkanüle in der Ohr- randvene angebracht und die Tiere wurden intubiert. Während der Operation wurden die Kaninchen mit dem Narkosegas Enfluran und einem Gasmisch aus Sauerstoff (O₂) und Lachgas (N₂O) beatmet. Der intraoperative Flüssigkeitsverlust wurde mit 250 ml einer 0,9 %igen NaCl-Infusion ausgeglichen, der zuvor 2 ml Lidocain (1 %) zugesetzt wurden, um einem Kammerflimmern vorzubeugen.

3.4.2 In-situ-Messungen

Während des gesamten operativen Eingriffes wurde ein EKG zur Rhythmus- und Frequenzüberwachung abgeleitet. Die Körpertemperatur wurde kontinuierlich überwacht und mit Hilfe eines Heizkissens bei ca. 39 °C gehalten. Nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe wurde eine seitliche Thorakotomie im vierten Inter-

kostalraum links durchgeführt. Nach Perikarderöffnung wurde ein Flussmesskopf (4SB256, Transonic Systems) um die A. pulmonalis platziert und mit einem Flussmessgerät (T206 2-channel, Transonic Systems) verbunden. Zur Messung des linksventrikulären Drucks wurde ein Nadeltipkatheter (3F, Millar) über die Herzspitze in den linken Ventrikel eingeführt.

Zur Blutgasanalyse und zur Bestimmung weiterer Laborparameter wurde den Kaninchen 7 ml Blut aus dem linken Ventrikel entnommen. An die Instrumentierung schloss sich eine 30 min Stabilisierungsphase an, um eine Erholung von operationsbedingten Irritationen zu ermöglichen.

3.4.3 Setzen der Myokardischämie

Die Kaninchen wurden nach dem Zufallsprinzip einer von vier Versuchsgruppen zugeordnet. Bei der Placebo-, der Betablocker- und der Ivabradin-Gruppe wurde eine Myokardischämie gesetzt. Ein Hauptast der linken Koronararterie wurde im oberen Drittel nach Abgang ligiert. Bei Auftreten von Kammerflimmern wurde Lidocain (1 mg/kg) gegeben. Bei Bedarf wurde mit 2,0 J epikardial defibrilliert und / oder eine Herzdruckmassage durchgeführt. Wenn die Kaninchen hämodynamisch und elektrisch stabil waren, wurden erneut 7 ml Blut für eine Blutgasanalyse entnommen. Nach Blähen der Lunge wurde der Thorax schichtweise verschlossen.

Während der Operation erhielten die Tiere je nach randomisierter Gruppenzuteilung entweder einen β -Blocker (Metoprolol 0,25 mg/kg ; 1 mg/ml NaCl), physiologische Kochsalzlösung (0,25 ml/kg) oder Ivabradin (0,25 mg/kg ; 1mg/ml NaCl) (Abb.8).

Als Antibiotikaprophylaxe erhielten die Tiere s.c. Amoxicillin (0,3 ml) und als Analgetikum s.c. Dipidolor (0,3 ml). In den darauffolgenden vier Wochen wurde den

Kaninchen je nach Gruppe Metoprolol oder Ivabradin (0,25 mg/kg) einmal täglich oral verabreicht.

3.4.4 Blutgasanalyse

Die Messungen des pH-Wertes, des pO_2 und pCO_2 dienten der Überprüfung der Konstanz der Versuchsbedingungen. Blutproben (0,5 ml) wurden nach der Narkoseeinleitung und nach der Medikamentengabe gemessen. Bei Bedarf wurden die Blutgase korrigiert.

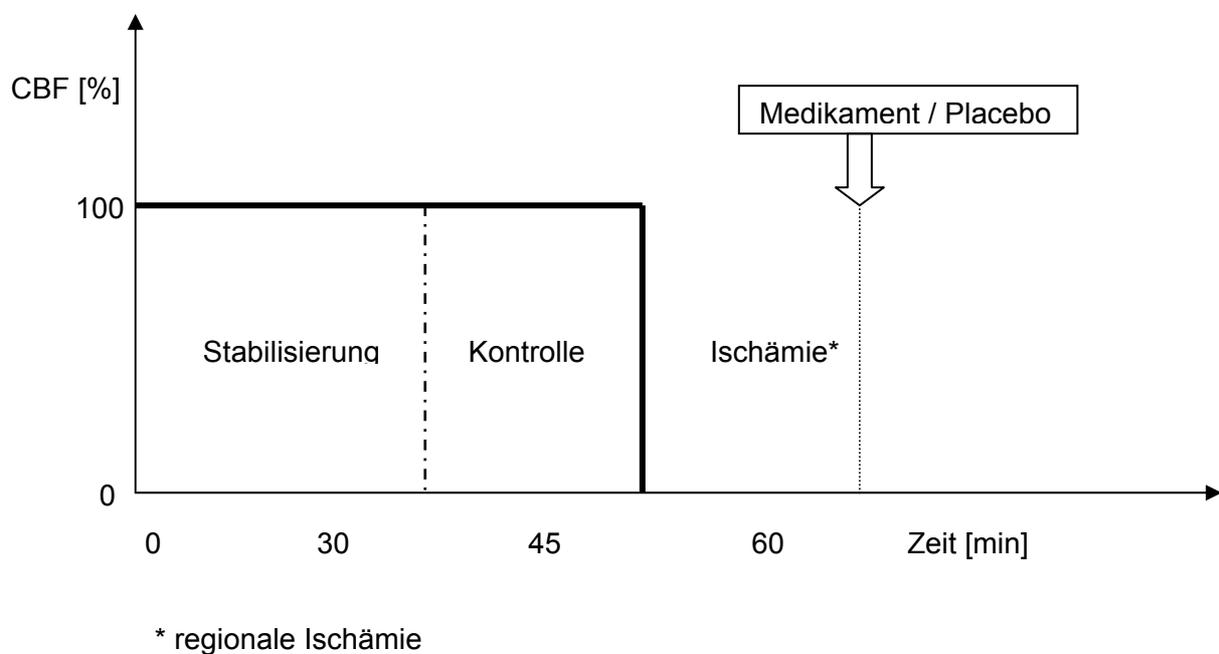


Abb. 8: Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls. CBF: Koronardurchblutung

3.5 Zweites Operatives Verfahren

3.5.1 Narkose und Einleitung

Die Tiere erhielten eine i.m. Kombinationsanästhesie aus 10 % Ketaminhydrochlorid (30 mg/kg; Ketavet[®], Pharmacia & Upjohn GmbH, DE) und 2 % Xylazinhydrochlorid (5 mg/kg; Rompun[®], Bayer Vital GmbH & Co, DE). Zur i.v. Applikation weiterer Arzneimittel wurde ein Zugang zu einer Ohrvene geschaffen. Eine aus-

reichende Narkosetiefe wurde bei Bedarf durch eine fraktionierte Gabe von 0,2 - 0,6 mg 0,1 % Flunitrazepan (i.v.; Rohypnol[®], Hoffmann-La Roche AG) gewährleistet. Es folgten Tracheotomie (5. – 6. Trachealknorpel) und Intubation (Endotrachealkanüle von 3,2 – 3,6 mm Innendurchmesser, Laboratoires pharmaceutiques VYGON, FR). Die Muskulatur wurde mit 1,0 mg 0,2 % Pancuroniumbromid (i.v.; Pancuronium[®], Organon Teknika Medizinische Produkte GmbH, DE) relaxiert. Im Anschluss wurden die Tiere mit einem Kleintierrespirator (Model 7025, Ugo Basile Comercio, IT) mit einer Atemfrequenz von 30 – 35 min⁻¹ und einem Atemzugvolumen von 20 – 30 ml [Altman PL und Dittmer DS, 1974] mit einem Raumluft-Sauerstoff-Gemisch kontrolliert beatmet.

3.5.2 In-situ-Messung

Der Thorax wurde durch eine mediane Sternotomie eröffnet, das Thymusgewebe aus dem Operationsfeld entfernt und das Perikard eröffnet. Zum Zeitpunkt der Perikardiotomie erhielten die Tiere 2.500 I.E. Heparin-Natrium (i.v.; Liquemin[®] N25000, Hoffmann-La Roche AG; DE), um einer Thrombenbildung vorzubeugen.

Die rechte V. jugularis und die linke A. carotis wurden für venöse bzw. arterielle Messungen kanüliert. Es wurde ein Flussmesskopf (4SB256, Transonic Systems, Ithaca, US) um die Aorta ascendens platziert und mit einem Flussmessgerät (T206 2-channel, Transonic Systems, Ithaca; US) verbunden, um den Aortenfluss zu messen. Zur Messung des linksventrikulären Drucks wurde ein Nadel-tipkatheter (3F, Millar; US) über die Herzspitze in den linken Ventrikel eingeführt.

Es folgte eine 30 min Stabilisierungsphase. Am Ende der anschließenden 15 min Kontrollphase wurden die hämodynamischen Werte erfasst.

3.5.3 Blutgasanalyse

Um die Konstanz der Versuchsbedingungen zu überprüfen wurden auch hier regelmäßig Blutproben (0,5 ml) entnommen und der pH-Wert, pO_2 und pCO_2 gemessen. Bei Bedarf wurden diese Werte korrigiert.

3.5.4 Isolation der Herzen

Die aufsteigende Aorta und der Truncus pulmonalis wurde dargestellt und mit einem Faden (Vicryl[®] Polyglactin 910, 2-0 USP, Ethicon, US) umschlungen. Die untere Hohlvene wurde abgeklemmt und der Truncus pulmonalis durch einen Einschnitt eröffnet. Das Herz wurde entnommen und anschließend mit physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %) ausgewaschen. Nach dem Wiegen der Herzen wurden beide Vorhöfe entfernt. Gewebe aus dem Septum und aus beiden Ventrikeln wurde mit Hilfe eines Skalpells in Stücke geschnitten und in flüssigem Stickstoff gefroren. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei -80 °C aufbewahrt.

3.6 Datenregistrierung

Die Datenregistrierung erfolgte mit Hilfe eines Datenregistrierungs- und Analyse-Programmes (PowerLab;ADInstruments; DE). Die folgenden hämodynamischen Variablen wurden erfasst:

- HF = Herzfrequenz [1/min]
- $LVP_{\max/ed}$ = linksventrikulärer systolischer/enddiastolischer Druck [mmHg]
(3F Mikrotip-Manometer, Millar TC500)
- AoF = Aortenfluss [ml/min] = Herzzeitvolumen
(Transonic Systems Inc., T206)

- dP/dt_{\max} = maximale LV Druckänderungsgeschwindigkeit [mmHg/s]
- dP/dt_{\min} = maximale LV Relaxationsgeschwindigkeit [mmHg/s]

3.7 BNP-Bestimmung

Der BNP-Gehalt wurde im Kaninchenblut bestimmt. Dabei wurde den Tieren zu vier verschiedene Zeitpunkten Blut entnommen. Der erste Zeitpunkt lag nach der Narkoseeinleitung, der zweite lag nach der Medikamentengabe. Analog hierzu wurde bei den Sham-Tieren die zweite Blutentnahme 30 min nach OP-Beginn durchgeführt. Die dritte Blutentnahme erfolgte nach vier Wochen und die vierte während der zweiten Operation.

Dabei wurden jeweils 3 ml Vollblut entnommen und in ein gekühltes EDTA Blutröhrchen mit dem Zusatz Trasylol (50 μ l) gegeben. Im Anschluss wurden die Proben für 10 min bei 4000 rpm und 3°C zentrifugiert. Danach wurde jeweils etwa 1 ml des Plasmas in Eppendorfgefäße umgefüllt. Die Proben wurden dann bei -20 °C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Bestimmt wurde der BNP-Gehalt mittels eines Eluationsimmunoverfahrens (Brain Natriuretic Peptide-32 RIA Kit; Phoenix Pharmaceuticals, Inc, US). Die Auswertung der Proben hat das Labor Immundiagnostik AG, Bensheim durchgeführt. Dieser Assay wurde zur BNP-Analyse in humanem Plasma entwickelt. Einen entsprechenden Assay für Kaninchenplasma gibt es nach unseren Kenntnissen nicht. Da für Kaninchenplasma keine Referenzwerte bekannt sind, werden unsere Ergebnisse in willkürlichen Einheiten angegeben.

3.8 Minigel-Elektrophorese

3.8.1 Grundlagen der Methode

Während einer Elektrophorese wandern Moleküle ihrer Ladung entsprechend durch ein elektrisches Feld. Dieses Prinzip kann zur Trennung von Proteinen eingesetzt werden. Dadurch erhält man eine analytische Methode, die als einfach, schnell und hoch sensibel angesehen wird (Abb. 9).

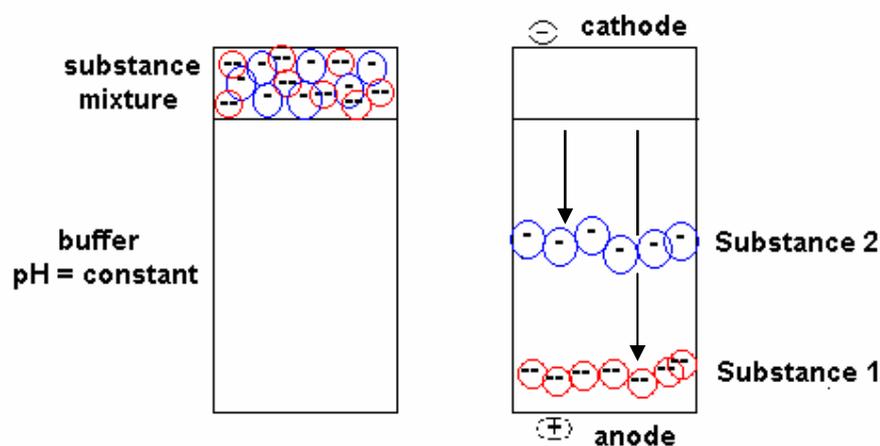


Abb. 9: Elektrophorese: Wanderung von geladenen Teilchen in einem elektrischen Feld; Ladung und Größe der Teilchen beeinflussen die Geschwindigkeit der Wanderung und die Art der Auftrennung.

Die Mobilität eines Moleküls durch dieses Feld hängt von der Stärke des Feldes, der Netzspannung, der Größe und Form des Moleküls, der Viskosität und Temperatur des Mediums, in dem sie sich bewegen und der Ladung des Moleküls ab [Lottspeich F und Zorbes H, 1998; Westermeier R, 1993].

Gelelektrophorese-Apparatur

Eine Elektrophorese-Apparatur [Lottspeich F und Zorbes H, 1998; Westermeier R, 1993] besteht grundsätzlich aus drei Teilen: Spannungsgerät, Kühl-

thermostat und Auftrennungskammer (Abb. 10). Die Teile werden mit einem Tank-system kombiniert.

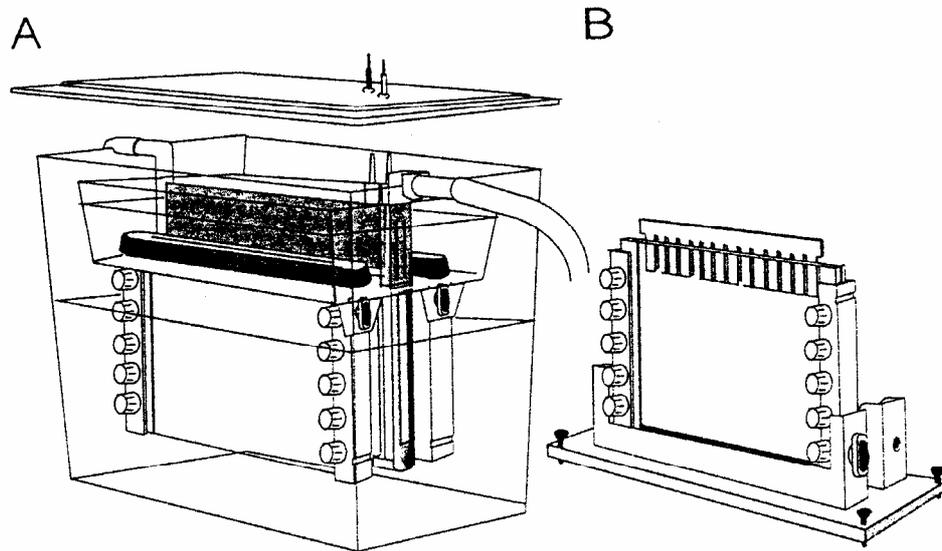


Abb. 10: Elektrophorese; **A:** Trennkammer mit Kühlung durch Rezirkulationspuffer
B: Gel-Guss-Zubehör mit Kamm für Bahnen

3.8.2 Probenaufbereitung

Untersucht wurde Gewebe aus dem linken und rechten Ventrikel, aus dem Vorhof und dem M. soleus. Das Gewebe wurde in einem eiskalten Puffer (100 mM Tetrasodium-Pyrophosphat, 2 mM 2-Mercaptoethanol, 5 mM EDTA, pH 8,8) [Katz AM, 1992] extrahiert. Für 1 mg Gewebe wurden 0,034 ml Puffer verwendet. Das Gewebe, das in flüssigem Stickstoff gefroren war, wurde mit Hilfe einer Zange zerkleinert und in den Puffer gegeben. Danach wurden die Proben mit einem Rotorstrator-Homogenisator (Micra, Genf, CH) drei Mal für jeweils 20 s homogenisiert. Die Proben wurden dann für 3 h bei 48.000 g und 3 °C in einer Ultrazentrifuge (L8-70M Ultrazentrifuge; Beckman, US) zentrifugiert. Der Überstand wurde 1:1 (v/v) mit Glycerin verdünnt und bei -80 °C aufbewahrt. Vor dem Auftragen der Proben wurde eine 1:5 Verdünnung mit Glycerin vorgenommen.

Proteinbestimmung des Extrakts

Die Proteinkonzentration der Proben wurde mit der Methode nach Bradford [Bradford MM, 1976] bestimmt. Für die Proteinanalyse wurde das Reagenz Bio-Rad verwendet. Nach einer 1:5 Verdünnung mit destilliertem Wasser kann es über 2 Wochen benutzt werden. Als Standardprotein wurde Rinderserumalbumin (BSA; 1,38 mg/ml) verwendet. Die Kalibrierungskurve wurde aus 0,00; 4,14; 8,28 und 16,56 µg Protein ermittelt. Die Reaktionszeit betrug 10 min und die Extinktion wurde bei 595 nm gemessen [Katz AM, 1992].

3.8.3 Elektrophorese

Es wurde eine nongradiente, nondenaturierte PAGE (Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese) im Minigelformat (Dicke 0,75 mm, Höhe 8 cm, Breite 10 cm) durchgeführt. Das Gel setzte sich zusammen aus 20 mM Tetrasodium-Pyrophosphat (pH 8,5); 45 % Glycerin (v/v); 6 % Acrylamid / bis-Acrylamid (wt/v), 40 % Lösung 29:1; 0,015 % TEMED; 0,12 % Ammoniumpersulfat (wt/v). Vor der Zugabe von TEMED und Ammoniumpersulfat wurde das Gelgemisch für 3 min entgast (Sonication, Sonorex RK156, Bandelin DE). Die Gelpolymerisation dauerte 2 h. Dann wurde Probenvolumen von 10 µl (Extrakt + Glycerin) pro Spur aufgetragen. Dies entsprach einer Proteinmenge von 6 µg (Ventrikel und M. soleus) und 10 µg (Atrium).

Der gekühlte Rezirkulationspuffer (max. 10 °C; 3 l) bestand aus 20 mM Tetrasodium-Pyrophosphat und 10 % Glycerin mit einem pH-Wert von 8,8. Der Puffer rezirkulierte zwischen dem Elektrophoresetank und einem Reservoir mittels einer Pumpe. Die Gele liefen über 20 h bei 120 V.

Die Banden konnten mittels Western-blot identifiziert werden. Die Reproduzierbarkeit dieser Methode wurde getestet.

Als interne Marker wurden Gewebeproben aus dem Atrium und aus dem M. soleus verwendet. Da man im Atrium fast ausschließlich V_1 findet, diene atriales Gewebe als Marker für V_1 . Als Marker für das Isoenzym V_3 diene Gewebe aus dem M. soleus des Kaninchens, welches überwiegend V_3 enthält (Abb. 11 und 12).

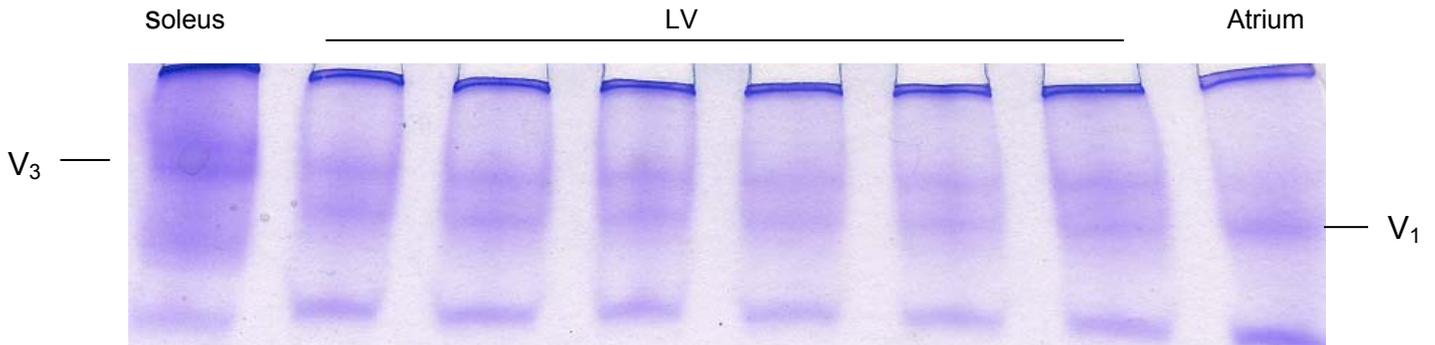


Abb. 11: (A) Acrylamidgel nach 20 h/120 V Elektrophorese. Gefärbt mit Coomassie. An den Seiten wurden interne Marker aufgetragen.

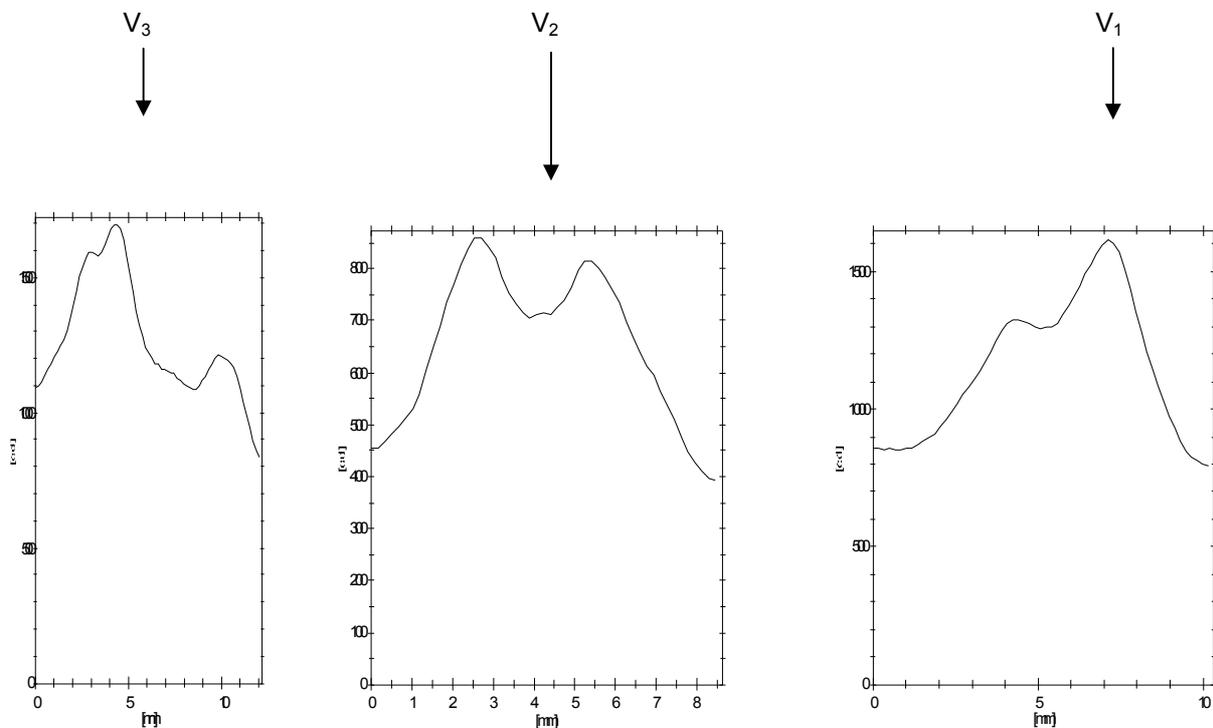


Abb. 12: (B) Links: Spektrum des Gewebes aus dem M. soleus; Marker für V_3 . Mitte: Spektrum des linksventrikulärem Gewebes. Rechts: Gewebe aus dem Atrium; Marker für V_1 .

3.8.4 Färben, Entfärben und Auswertung

Um die Proteindiffusion zu begrenzen, wurden die Gele für 15 min in eine 10 %ige Trichloressigsäurelösung (wt/v) gegeben. Danach wurden sie für 20 min mit einer Lösung, aus 0,05 %iger Coomassie brilliant blue (w/v) (R 250, Sigma, Steinheim, DE), 50 % Methanol (v/v), 10 % Essigsäure (v/v) und 40 % desti. Wasser angefärbt. Die Entfärbung erfolgte während einer Stunde in einer Lösung aus 30 % Methanol (v/v), 10 % Essigsäure und 70 % dest. Wasser. Färben und Entfärben fand in einem Wasserbad mit einer konstanten Temperatur von 40 °C statt.

Die Intensität der Banden wurde densitometrisch bestimmt. Nach dem Einscannen der Gele (ScanJet-Hewlett / Packard, US), fand eine Bearbeitung mit dem Softwareprogramm TINA (TINA/Software 2.09, Isotopen apparatus GmbH, UK) statt, wobei der relative Anteil der Banden zueinander berechnet wurde. Die Werte wurden in eine Tabelle eingetragen, wobei besonders der prozentuale Wert (od-Bkg) von Interesse war. Dieser ist ein Maß für die Intensität der einzelnen Banden ohne deren Hintergrund (Abb. 13).

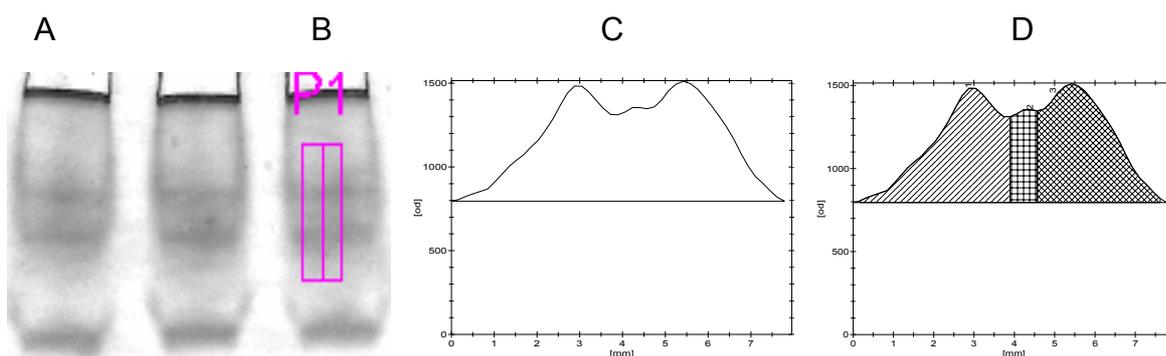


Abb. 13: Auswertung der MHC Isoenzyme mit TINA Software. Es wird die relative Menge der Banden bestimmt, wobei der ganze Bereich 100% entspricht. Die Abbildung zeigt die Banden nach dem Scannen (A); das Intensitätsspektrum der Banden nach Beurteilung mit TINA (B); die Bereiche der einzelnen Banden nach Markierung (C). Die Größe der Bereiche (D) gibt die relative Menge der Isoenzyme wieder.

Tab. 2: Auswertung mit TINA-Software: Die Werte in der Tabelle beziehen sich auf Abb: 13.
Od: optische Sensitivität; Bkg: Hintergrund

N° bands	Pos [mm]	Od	Od-Bkg	% (Od-Bkg)
1	2,54	25234	7741	42.13
2	4,23	5348	2167	11.80
3	5,59	22781	8464	46.07
total				100.00

3.9 Infarktgröße

Zur Färbung des durchbluteten Myokards wurde eine Triphenyl-Tetrazoliumchlorid-(TTC) Färbung durchgeführt. Nach Perfusion der Herzen mit einer 10%igen Evans Blue Lösung wurden sie tiefgefroren. Später wurden die Herzen parallel zur atrioventrikulären Furche in 5 bis 6 gleich dicke Scheiben geschnitten. Die Gewebescheiben wurden in einer 1% TTC-Lösung in isotonischem Phosphatpuffer (pH 7,4) bei einer Temperatur von 37°C für 15 min inkubiert. Hiernach zeigte nekrotisches Gewebe eine graue, durchblutetes Gewebe eine blaue und gefährdetes Myokard eine rote Farbe. Der gefährdete Bereich sowie das Infarktareal wurden unter Verwendung einer Bild-Analysierungs-Software (MS Autosketch) mittels Planimetrie berechnet.

3.10 Statistik

Die Daten werden als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Bei den MyosinIsoenzymen wird die relative Menge angegeben und bei den BNP-Werten willkürliche Einheiten.

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS (SPSS, Schweiz AG, CH) vorgenommen. Dabei wurde zunächst mit Hilfe einer Ein-Wege-Varianzanalyse der Unterschied innerhalb eines Protokolls geschätzt. Ergab die Varianzanalyse mit $p < 0,05$ gesicherte Unterschiede, wurde im Anschluss ein post-hoc Test nach Bonferroni durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 In-situ-Messungen

Im Folgenden werden die Ergebnisse der in-situ-Untersuchungen aller vier Gruppen vorgestellt. Die Ergebnisse werden in Diagrammen (Mittelwert \pm Standardabweichung) dargestellt. Zur Überschaubarkeit der Diagramme wurden die Standardabweichungen nur für jeweils zwei Versuchsgruppen angegeben. Es werden jeweils die Parameter zum Zeitpunkt der Kontrolle, nach der Ligatur, nach der ersten intraoperativen Medikamentengabe und nach 4 Wochen angegeben.

Herzfrequenz: Zu Beginn unterschied sich die Herzfrequenz der vier Versuchsgruppen nicht voneinander. Sie war bis zum Setzen der Ligatur konstant und lag bei 225 ± 29 /min. Eine Änderung der HF nach der Ligatur und der Pseudoligatur (in der Sham-Gruppe) blieb aus. Die Gabe von Metoprolol oder NaCl beeinflusste die HF nicht, jedoch führte die Gabe von Ivabradin zu einer Frequenzsenkung auf 190 ± 30 /min (-16 %). Nach vier Wochen hatten alle vier Versuchsgruppen eine HF von 200 ± 32 /min (Abb. 14).

Aortenfluss (AoF): Der Aortenfluss zeigte in den ersten drei Messungen der Sham-Gruppe eine Erhöhung gegenüber den Werten der anderen drei Versuchsgruppen. Bei der Ausgangsmessung lag der AoF der Metoprolol-Gruppe erheblich unter den Werten der anderen Gruppen. Nach der Ligatur sank der Aortenfluss stärker in der Placebo- und Ivabradin-Gruppe. Nach vier Wochen lag der AoF in allen Gruppen bei etwa 200 ± 52 ml/min (Abb. 15).

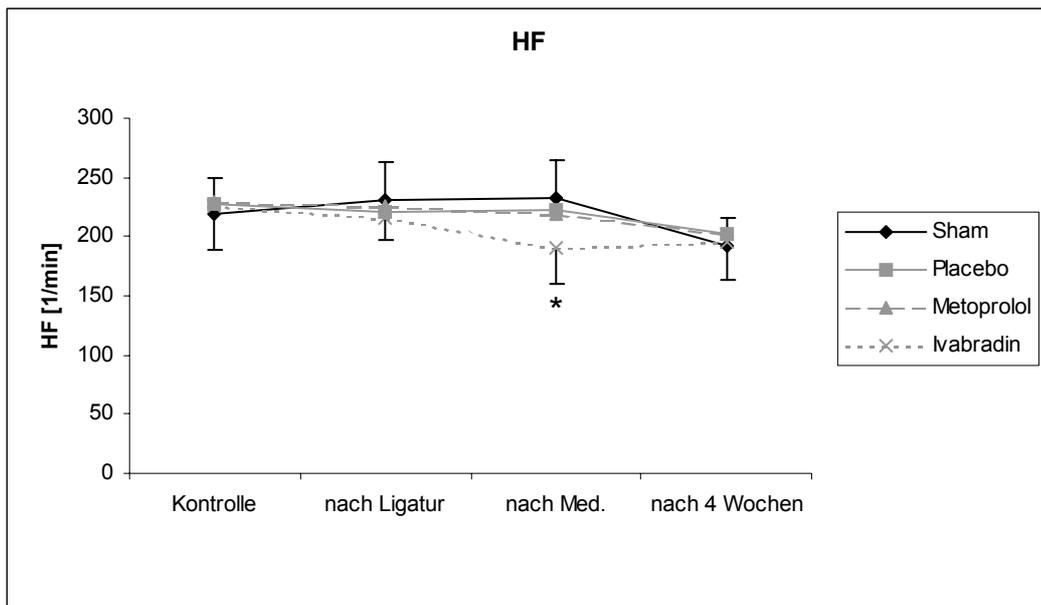


Abb. 14: Herzfrequenz [HF]. Nähere Erläuterung im Text. * $p < 0,05$ vs nach Ligatur

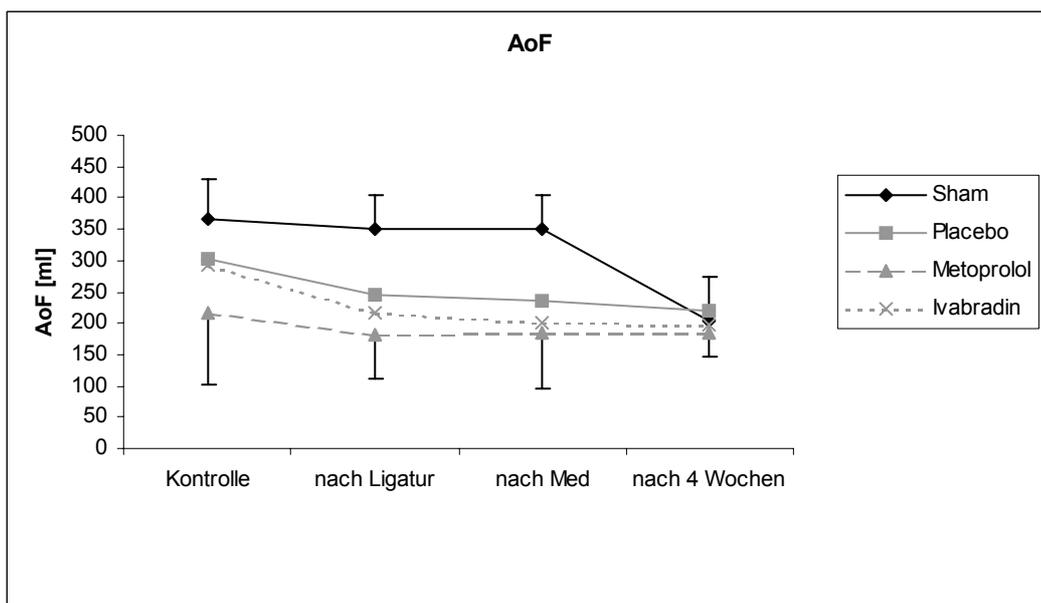


Abb. 15: Aortenfluss [AoF]. Nähere Erläuterung im Text.

Linksventrikulärer Spitzendruck: Der linksventrikuläre Spitzendruck (LVP_{max}) zeigte zu allen Messzeitpunkten keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Versuchsgruppen. LVP_{max} lag zum Kontrollzeitpunkt in den Gruppen zwischen 83 und 90 mmHg. Nach Ligatur blieb LVP_{max} konstant, allein in der Metoprololgruppe kam es zu einer Abnahme auf 73 ± 13 mmHg (-14 %). Auch nach Medikamenten-

gabe und nach vier Wochen wurde keine Veränderung von LVP_{max} in den Versuchsgruppen beobachtet (Abb. 16).

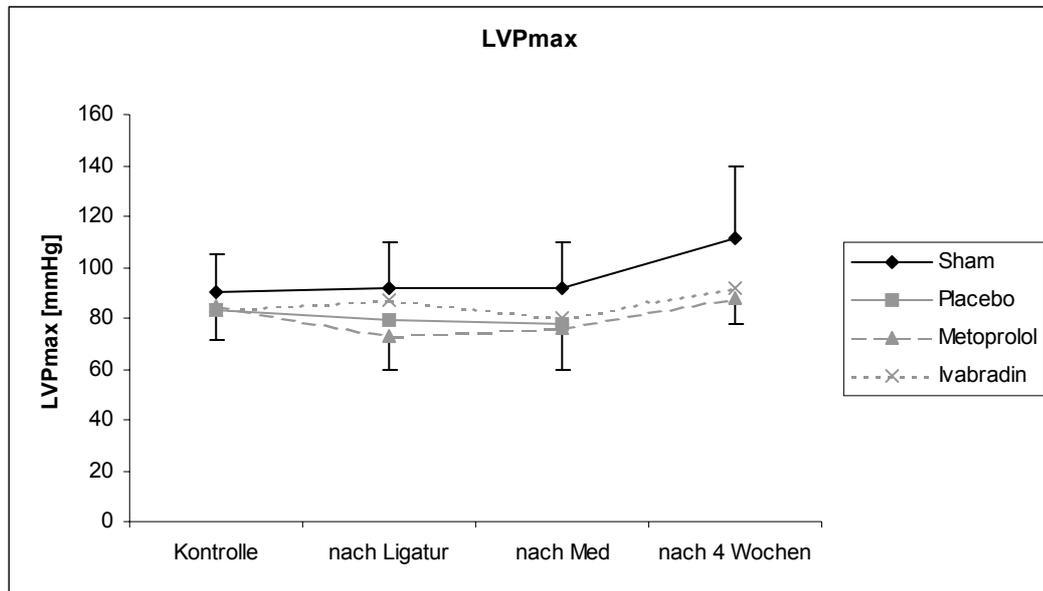


Abb.16: Maximaler linksventrikulärer Spitzendruck [LVP_{max}]. Nähere Erläuterung im Text.

Maximale linksventrikuläre Druckänderungsgeschwindigkeit: Die maximale linksventrikuläre Druckänderungsgeschwindigkeit (dP/dt_{max}) lag zum Kontrollzeitpunkt in allen Versuchsgruppen zwischen 1567 und 1956 mmHg/s. Sowohl nach Ligatur als auch nach der Medikamentengabe kam es zu keiner signifikanten Veränderung. Nach vier Wochen lag dP/dt_{max} zwischen 1805 und 2067 mmHg/s (Abb. 17).

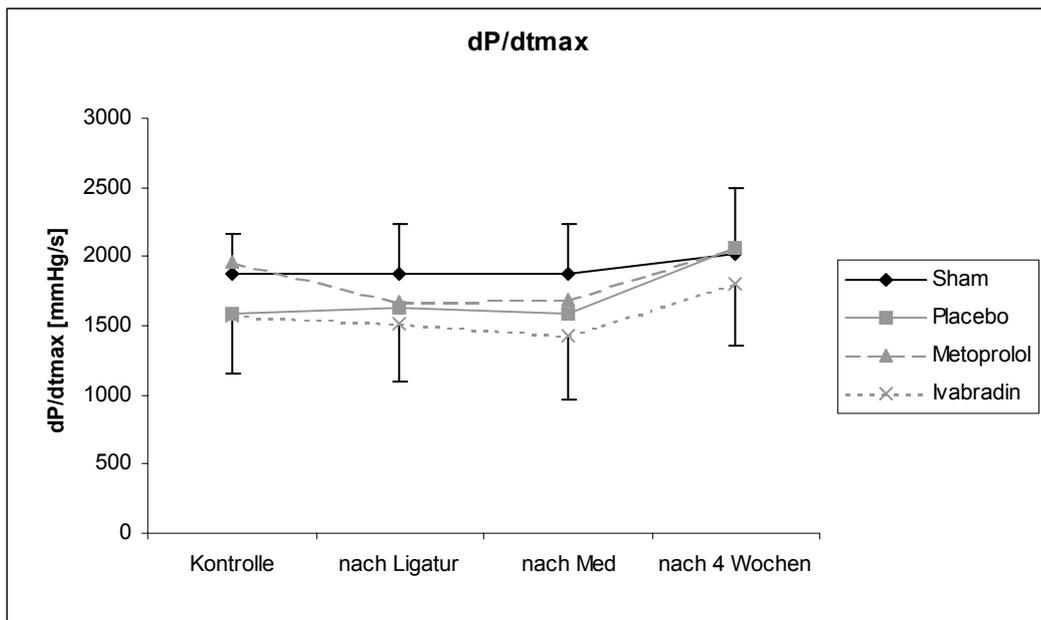


Abb. 17: Maximale Druckänderungsgeschwindigkeit [dP/dt_{max}]. Nähere Erläuterung im Text.

Minimale linksventrikuläre Druckänderungsgeschwindigkeit: dP/dt_{min} , als ein Maß für die frühe Relaxation, lag unter Kontrollbedingungen in allen Gruppen zwischen -1293 und -1697 mmHg/s. Im weiteren Versuchsverlauf traten keine signifikanten Veränderungen auf (Abb. 18).

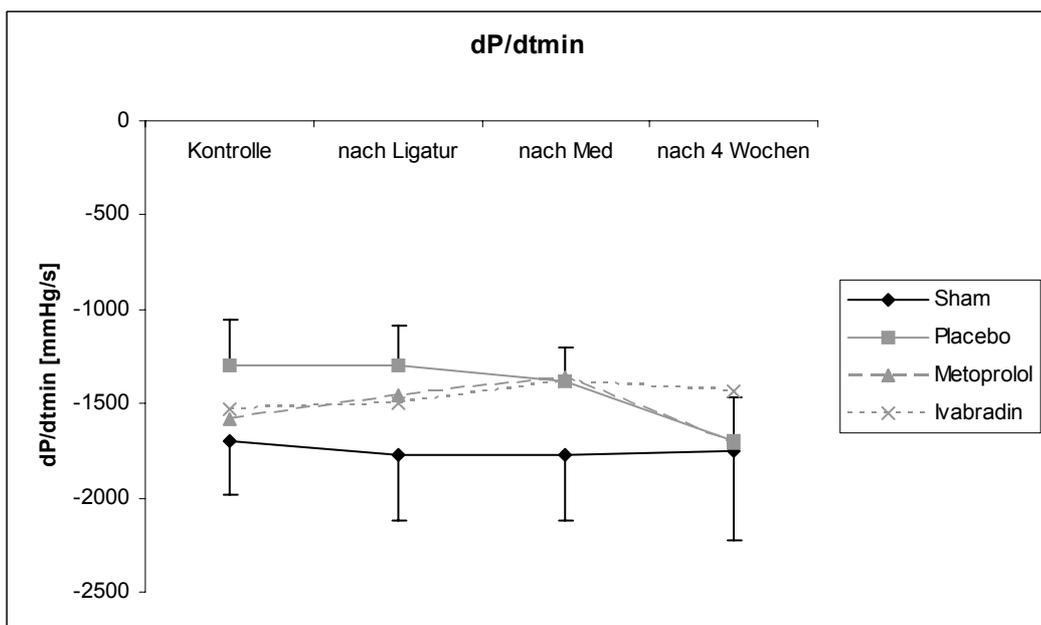


Abb.18: Maximale Relaxationsgeschwindigkeit [dP/dt_{min}]. Nähere Erläuterung im Text.

Linksventrikulärer enddiastolischer Druck: LVP_{ed} lag in allen Versuchsgruppen zum Kontrollzeitpunkt zwischen 12 und 16 mmHg. Es kam im weiteren Verlauf des Versuchprotokolls zu keinen signifikanten Änderungen von LVP_{ed} (Abb. 19).

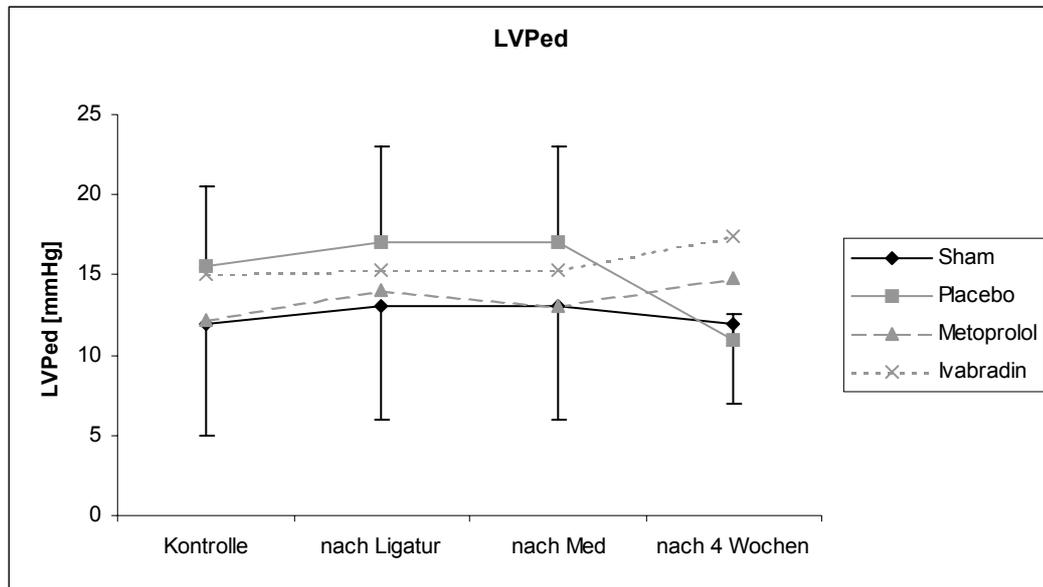


Abb. 19: Minimaler enddiastolischer linksventrikulärer Druck [LVP_{ed}]. Nähere Erläuterung im Text.

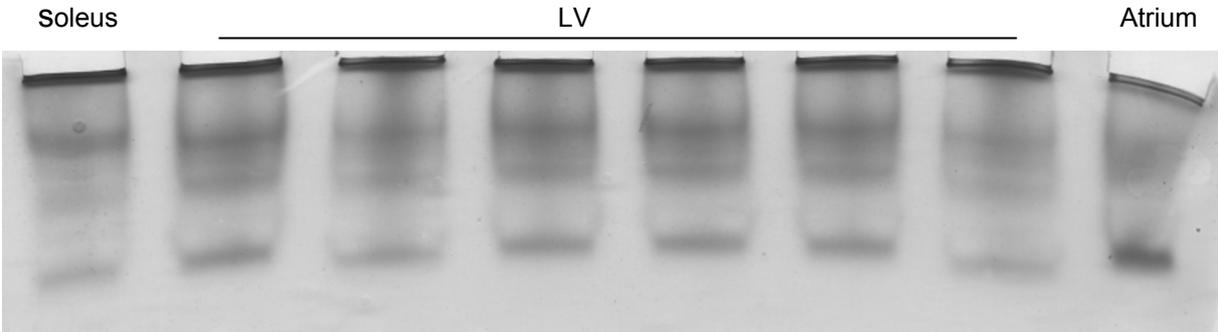
4.2 Myosin-Isoenzyme

4.2.1 Vergleich der Gruppen

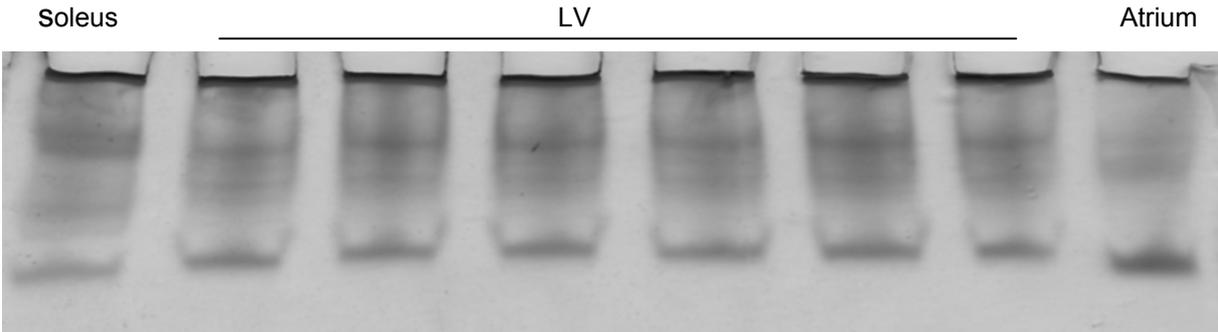
Bei der Analyse des Gewebes fand sich bei den Sham-Tieren ($n=3$) im linken Ventrikel (LV) folgende Myosinzusammensetzung: V_1 $39,4 \pm 2,9$ %; V_2 $15,3 \pm 1,7$ % und V_3 $45,4 \pm 2,7$ %. In der Placebo-Gruppe ($n=4$) war der V_1 -Gehalt auf $21,7 \pm 2,9$ % gesunken, V_2 konnte nicht mehr nachgewiesen werden und V_3 dominierte nun mit $78,3 \pm 2,9$ %. Bei den Metoprolol-Tieren ($n=3$) war V_1 mit $36,7 \pm 4,6$ % vertreten, der V_3 Gehalt lag bei $63,4 \pm 4,6$ %. In der Ivabradin-Gruppe ($n=3$) dominierte V_3 über V_1 mit $61,7 \pm 3,4$ %. In beiden Gruppen konnte kein V_2 nachgewiesen werden. Ähnliche Veränderungen fanden sich auch im rechten Ventrikel (RV) und im Septum

(Abb. 20-23). Aufgrund der geringen Fallzahl wurde auf eine statistische Analyse verzichtet.

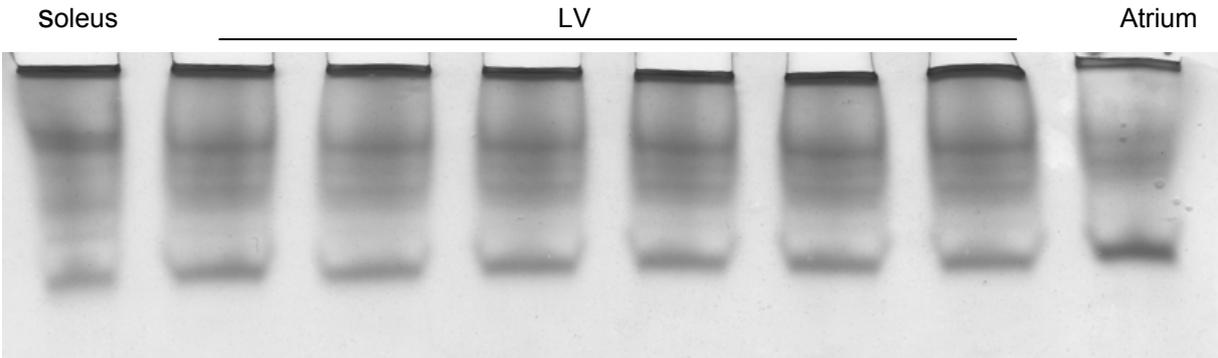
Sham



Placebo



Metoprolol



Ivabradin

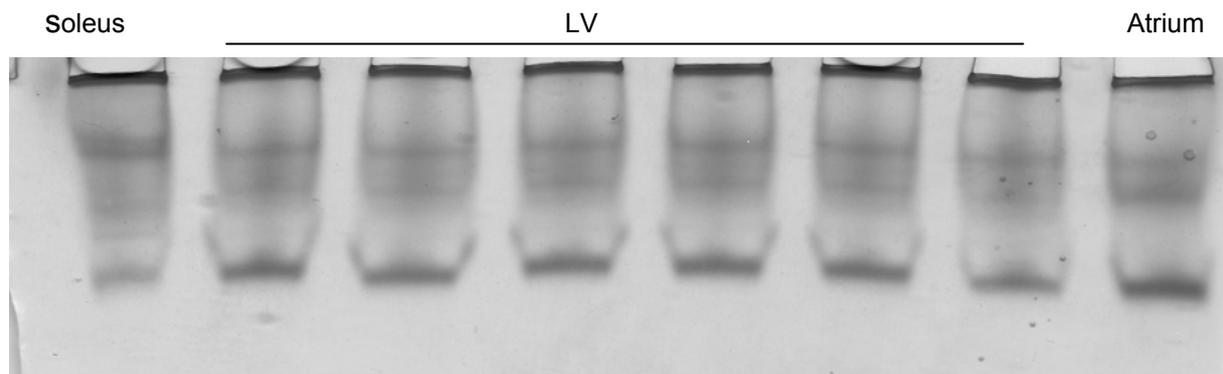


Abb. 20: Acrylamidgel mit Proben der verschiedenen Gruppen. An den Seiten wurden interne Marker für V1 (Atrium) und V3 (M. soleus) aufgetragen.

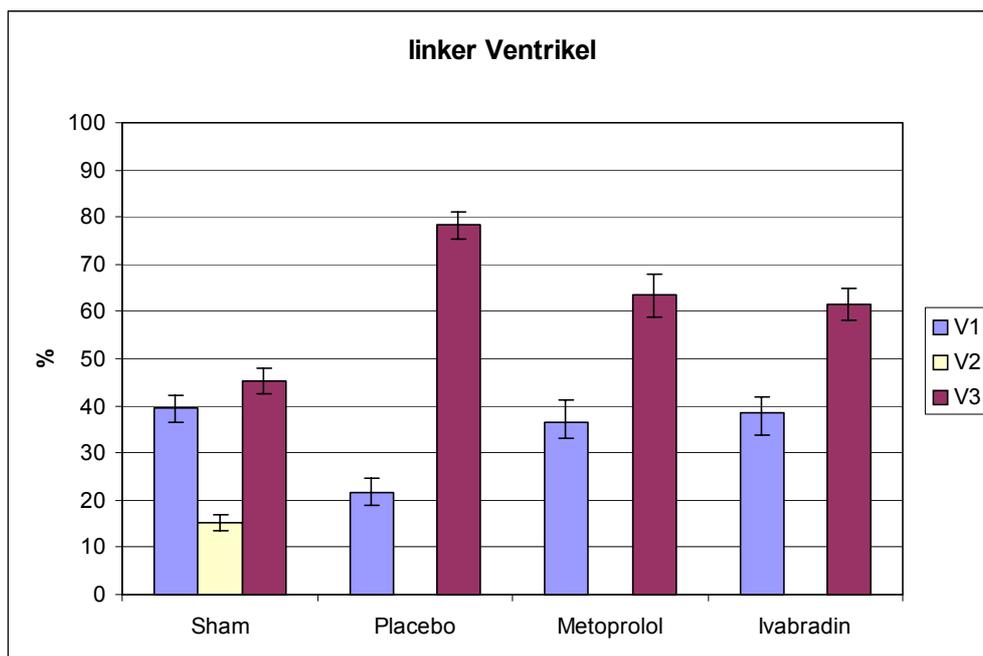


Abb. 21: Verteilung der Isoenzyme im linken Ventrikel. Die Sham-Herzen sind normoxisch. In der Placebo-, Metoprolol- und Ivabradin-Gruppe zeigte sich in Herzen mit chronischem Infarkt eine relative Zunahme von V₃ und ein Verlust von V₂.

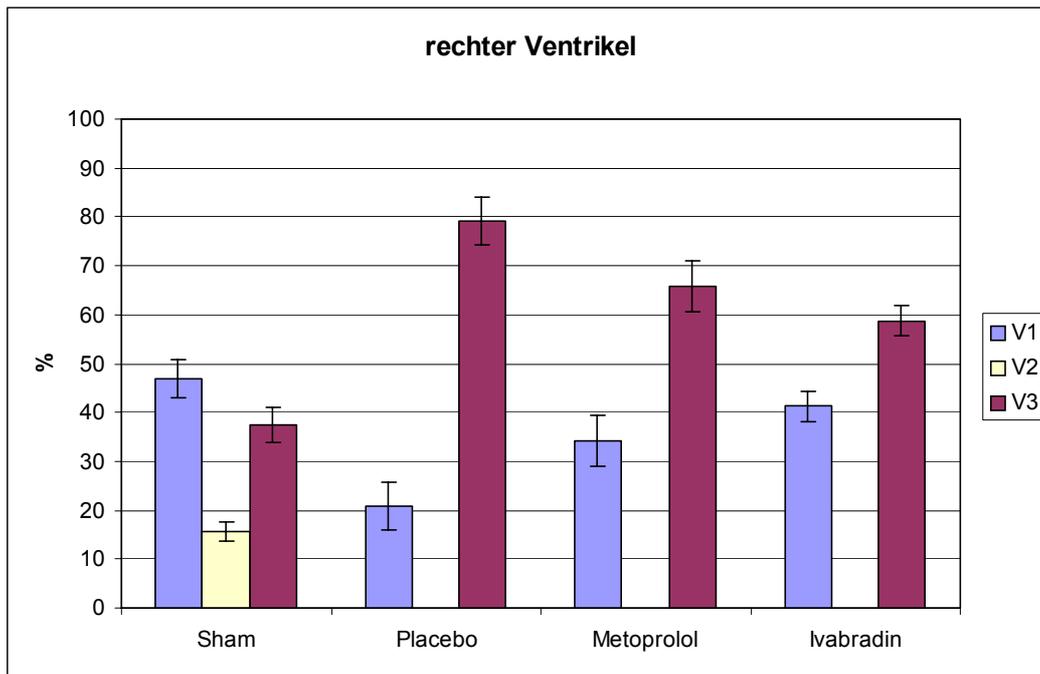


Abb. 22: Isoenzym-Verteilung im normoxischen (Sham) und im RV Myokard von Herzen mit chronischem Infarkt.

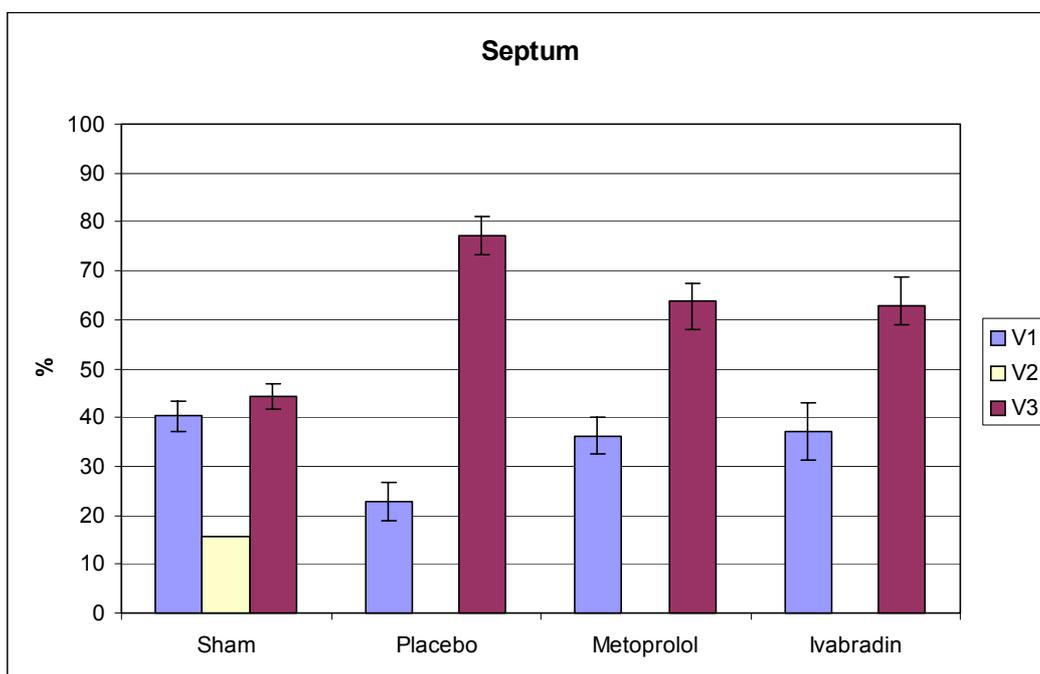


Abb. 23: Isoenzym-Verteilung im Septum. Im normoxischen Gewebe (Sham) sind V1 und V3 etwa gleich stark vertreten. Nach Infarkt und Medikation kommt es zu einem relativen Anstieg von V₃ und zum Verlust von V₁.

4.2.2 Vergleich LV, RV und Septum

Beim Vergleich der verschiedenen Gewebeareale zeigten sich keine Unterschiede. In der Sham-Gruppe lag der V₃-Gehalt im linken Ventrikel bei $45,4 \pm 2,7$ %. Im rechten Ventrikel fand sich ein Gehalt von $46,9 \pm 3,6$ % und im Septum $44,2 \pm 2,6$ %. In der Placebo-Gruppe lag der LV V₃ Gehalt bei $78,3 \pm 2,9$, im RV bei $79,2 \pm 4,9$ und im Septum bei $77,2 \pm 4,0$. Auch in den beiden Substanzgruppen wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen LV, RV und Septum beobachtet (Abb. 24-27).

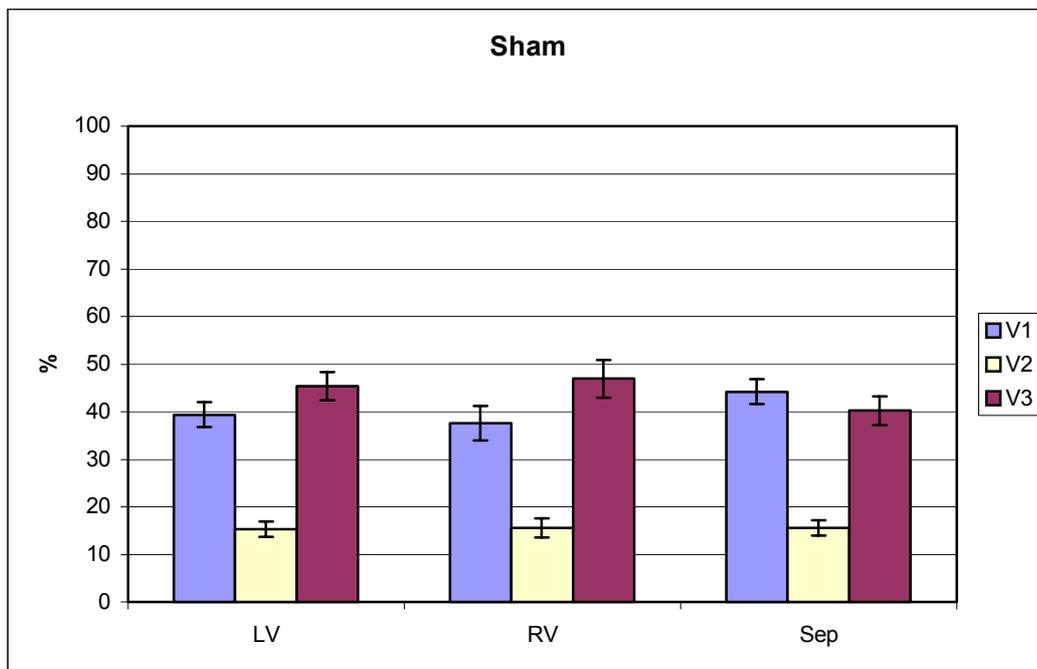


Abb. 24: Isoenzym-Verteilung bei der Sham-Gruppe. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen LV, RV und Septum.

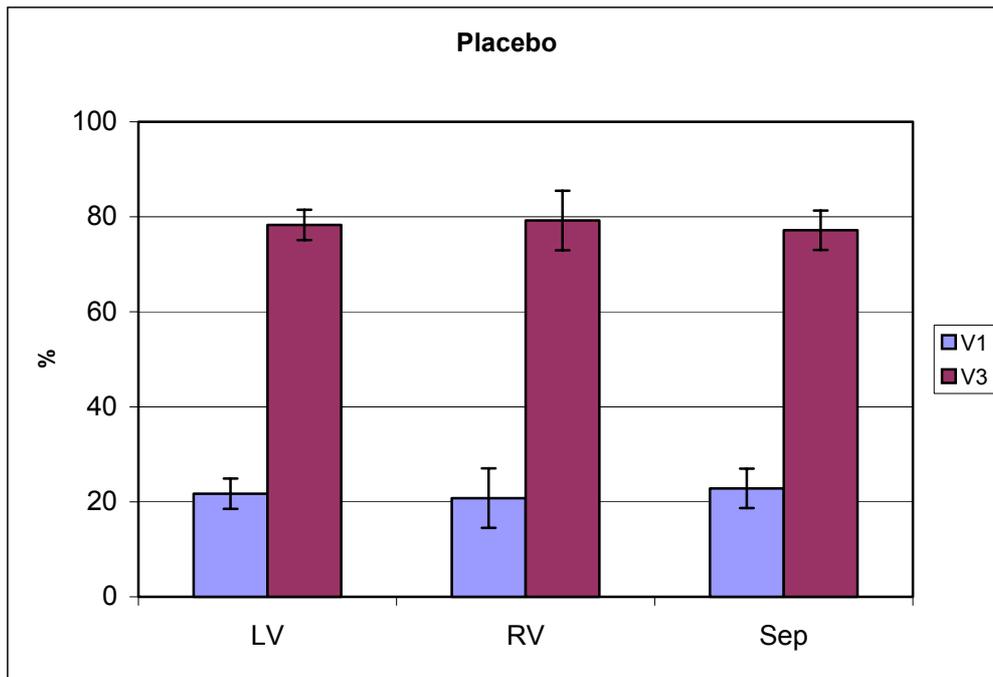


Abb. 25: Isoenzym-Verteilung bei der Placebo-Gruppe. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen LV, RV und Septum.

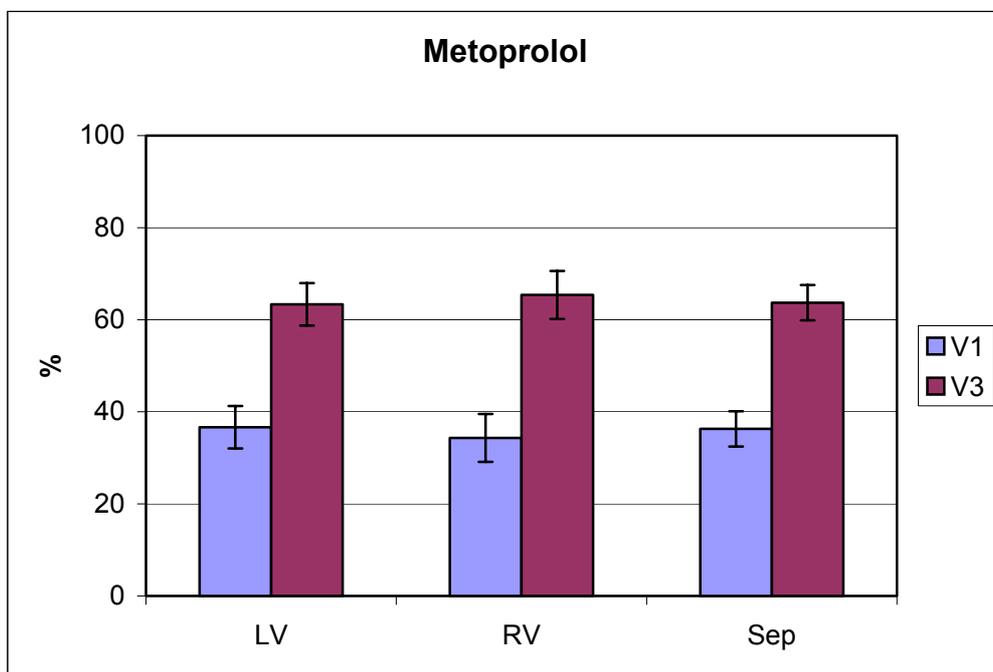


Abb. 26: Isoenzym-Verteilung bei der Metoprolol-Gruppe. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen LV, RV und Septum.

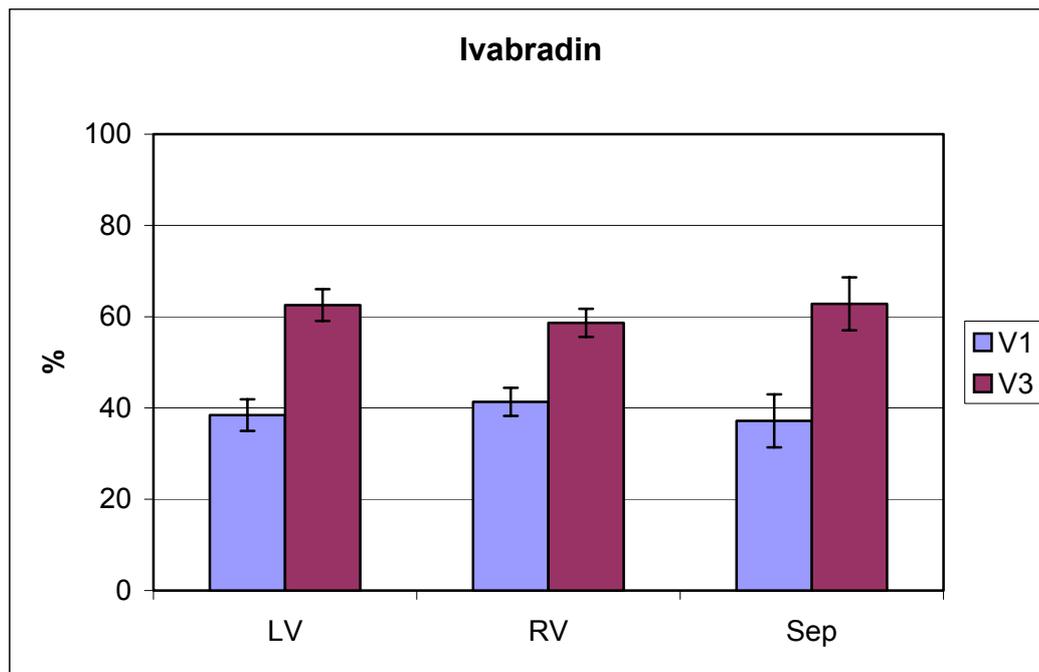


Abb. 27: Isoenzym-Verteilung bei der Ivabradin-Gruppe. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen LV, RV und Septum.

4.3 BNP-Bestimmung

Die BNP-Werte waren während Kontrolle zwischen den einzelnen Gruppen nicht unterschiedlich. Der Wert lag bei $7,20 \pm 0,81$ w.E.. Nach Pseudo-Ligatur oder nach Ligatur blieb der BNP-Gehalt in allen vier Versuchsgruppen im wesentlichen unverändert. 24 h nach der Operation konnte ein marginaler Anstieg des BNP beobachtet werden. Allein in der Placebogruppe war dieser Anstieg signifikant. Nach 4 Wochen wurde ein Gehalt von $7,08 \pm 1,47$ pg/ml gemessen. Im Vergleich der vier verschiedenen Gruppen zeigten sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede (Abb. 28).

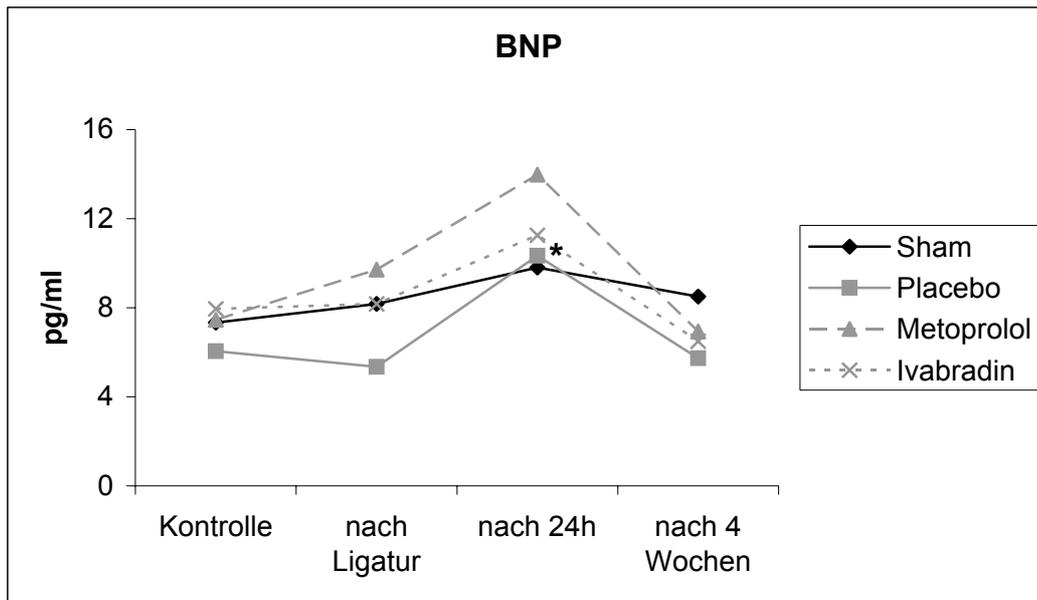


Abb. 28: BNP-Gehalt im Kaninchenblut zu verschiedenen Zeitpunkten. 24 h nach der Operation waren die BNP-Spiegel in allen Gruppen angestiegen. Dieser Anstieg war in der Placebo-Gruppe signifikant * $p < 0,05$ vs nach Ligatur.

4.4 Infarktgröße

Die mittlere Infarktgröße in den mit Metoprolol und Ivabradin behandelten Gruppen lag bei $39 \pm 8\%$ und $30 \pm 4\%$. In der Placebo-Gruppe war die Infarktgröße im Vergleich zu den Medikamentengruppen mit $54 \pm 6\%$ signifikant höher (Abb. 29).

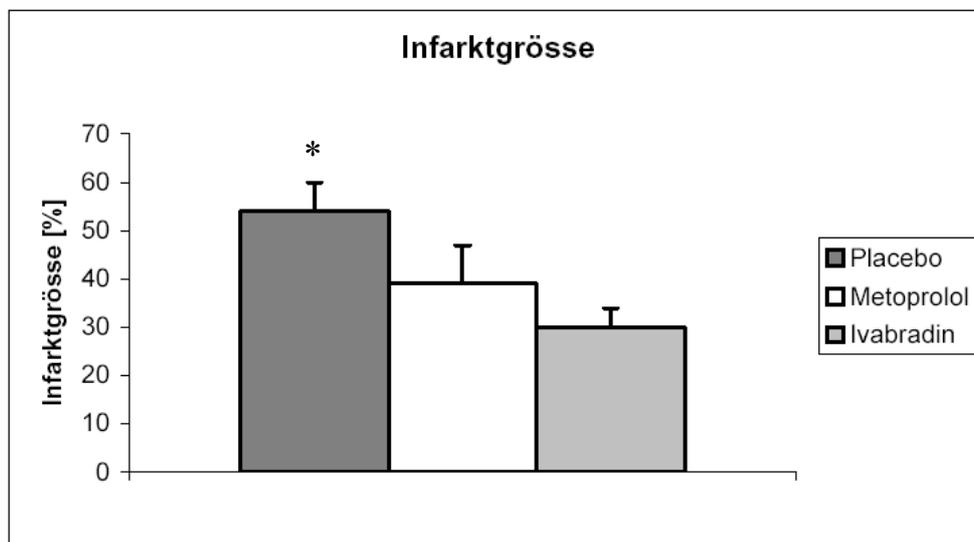


Abb. 29: Infarktgröße. * $p < 0,05$ vs. Metoprolol und Ivabradin; nähere Erläuterung im Text.

4.5 Mortalität

Nach Ligatur und Medikamenten- oder Placebogabe verstarben insgesamt 11 Versuchstiere. Die meisten verstarben in der Placebo-Gruppe (n=6). In der β -Blocker- und der Ivabradin-Gruppe waren es 2 bzw. 3 Tiere (Abb. 30).

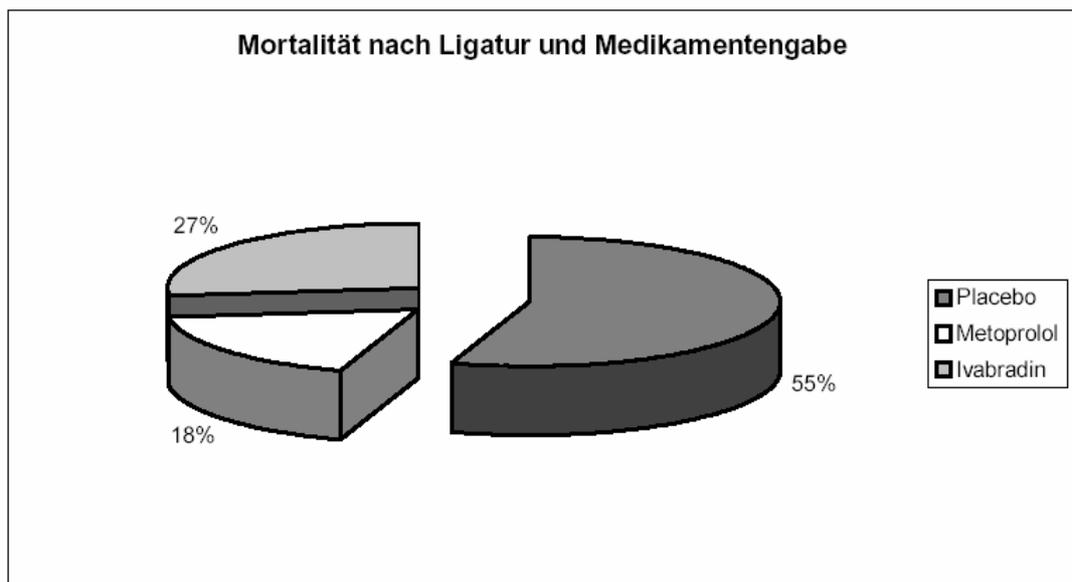


Abb. 30: Mortalität nach Ligatur und Medikamentengabe; nähere Erläuterung im Text.

5 Diskussion

Ein Myokardinfarkt führt zunächst zu biochemischen, strukturellen und elektrophysiologischen Veränderungen des ischämischen und in der Folge auch des nichtischämischen Gewebes. Der myokardiale Remodellingprozess umfasst eine Hypertrophie des Myokards, eine Dilatation des Ventrikels, eine Verringerung der systolischen und diastolischen Leistung und eine Veränderung der Zusammensetzung der Myosin-Isoenzyme, die aus einer veränderte Genexpression von Proteinen resultiert [Swynghedauw B *et al.*, 1989; Opie LH *et al.*, 2006]. Der Prozess des Remodellings wird durch unterschiedliche Faktoren verursacht und kann durch Medikamente beeinflusst werden.

Es war ein Ziel der vorliegenden Studie, die Auswirkungen des β -Adrenorezeptor-Blockers Metoprolol und der spezifisch bradykarden Substanz Ivabradin auf die Herzfrequenz und die ventrikuläre Funktion in Herzen mit chronischem Infarkt zu untersuchen. Um die Funktion des Herzens zu erfassen, wurden als systolische Größen Aortenfluss, maximale Druckänderungsgeschwindigkeit (dp/dt_{max}) maximaler linksventrikulärer Druck (LVP_{max}) und minimale enddiastolische linksventrikuläre Druck (LVP_{ed}) erfasst. Es sollte weiter untersucht werden, ob die Gabe der Substanzen einen Einfluss auf das ventrikuläre Remodelling insbesondere auf der Ebene der Kardiomyozyten hat. Daher wurde in einem Modell eines chronischen Infarktes an Kaninchen untersucht, ob Metoprolol oder Ivabradin den bekannten Myosinshift von V_1 - zu V_3 -Isoenzymen [Swynghedauw B, 1989] beeinflussen können. Letztlich wurde untersucht, ob die auf der funktionellen Ebene beobachteten Veränderungen mit Veränderungen der BNP-Spiegel korrelierten, da BNP in den letzten Jahren als neurohumoraler Marker für die ventrikuläre Funktion und die Prognose in der Klinik eingesetzt wird [Richards AM *et al.*, 2003].

5.1 Hämodynamik

5.1.1 Metoprolol

Metoprolol ist ein β -Adrenozeptor-Antagonist, der im klinischen Alltag häufig in der Therapie des akuten Myokardinfarkts [Hjalmarson A *et al.*, 1997] und der Herzinsuffizienz eingesetzt wird [Bauman JL *et al.*, 2004]. β -Blockern werden kardioprotektive Eigenschaften zugesprochen, was den hohen Nutzen dieser Substanzen erklärt. Mechanismen, die für die hohe Effizienz der Behandlung durch β -Blockade verantwortlich gemacht werden, sind u.a.:

1. Verbesserung der β -Rezeptor Funktion [Heilbrumm SM *et al.*, 1989] ,
2. Protektion des Herzmuskels vor hohen Katecholaminkonzentrationen im Blut und deren Auswirkungen auf das Myokard [Tsutsui H *et al.*, 1994],
3. Senkung der Herzfrequenz, die zu einer Verbesserung des Energiehaushalts des Myokardgewebes führt [Moe GW *et al.*, 1992].

Alle Mechanismen führen zu einer Besserung der ventrikulären Funktion, die für die Prognose der Patienten von Bedeutung ist.

Nach einem Infarkt mit resultierender Herzinsuffizienz steigt der Plasma-gehalt von Noradrenalin an, und somit wird der Sympathikus aktiviert. Der erhöhte Sympathikotonus führt zu einer Downregulation der β -Rezeptoren, aus der eine Abnahme der Inotropie resultiert. Medikamente wie Metoprolol können diesen Verlust der Rezeptoren verhindern [Lechat, 1998].

Ein weiterer Mechanismus, der eine zentrale Rolle in der Kardioprotektion spielt, ist die negative Chronotropie. Eine Reduktion der Herzfrequenz verbessert den myokardialen Energiehaushalt, d.h. das Verhältnis zwischen Herzarbeit und O_2 -Verbrauch wird günstiger. Das Verhältnis zwischen dem myokardialen Blutfluss und der Sauerstoffausschöpfung des Herzens wird ebenfalls verbessert. Durch Reduktion

der HF kommt es zu einer besseren subendothelialen Perfusion des Myokards [Guth BD *et al.*, 1987] und zu einer Verlängerung der Diastolendauer, die zu einer besseren Versorgung des Herzmuskels beiträgt. Weiterhin können β -Blocker nach einem Infarkt reperfusionsbedingte Arrhythmien reduzieren, wobei hierfür ebenfalls der negativ chronotrope Effekt verantwortlich gemacht wird [Tosaki A *et al.*, 1987].

Zahlreiche Studien zeigen, dass die ventrikuläre Funktion durch β -Blockade gebessert werden kann. In einer Studie an Ratten hatte Metoprolol in der postischämischen Phase nach Myokardinfarkt positive Auswirkungen auf die Funktion des Herzens. Direkt nach dem chirurgischen Eingriff gab es zunächst keine Unterschiede in der Herzfrequenz zwischen den Gruppen. Bereits nach erstmaliger Gabe des β -Blockers kam es zu einer Senkung der Herzfrequenz um 31 %. Weiterhin führte Metoprolol zu einer Senkung des linksventrikulären Spitzendruckes während der enddiastolische Druck unverändert blieb [Jain P *et al.*, 1994]. In einer Studie an Schweinen fiel nach einem experimentell induzierten Myokardinfarkt und Atenolol-Infusion die Herzfrequenz [Schulz R *et al.*, 1995].

Auch an Kaninchen fiel nach Metoprolol die Herzfrequenz nach Ischämie. Zusammen mit der negativ inotropen Wirkung führte dies zu einer Reduktion der Infarktgröße [Feuerstein G *et al.*, 1998].

In unserer Studie kam es zu keinem Zeitpunkt zu signifikanten Veränderungen der Funktion durch Metoprolol. Die Herzfrequenz war lediglich tendentiell vermindert und auch die anderen Variablen blieben im wesentlichen unverändert. Eine mögliche Erklärung dieser Ergebnisse könnte die Wahl unserer Dosierung geben. In einer Studie an Rattenherzen senkte niedrig dosiertes Metoprolol (1 μ M oder 10 μ M) die Herzfrequenz nicht. Bei mittlerer (30 und 50 μ M) und hoher (100 / 200 μ M) Dosierung des Medikaments wurde die Herzfrequenz um 20 - 30 % reduziert [Tosaki A *et al.*, 1987]. Da es sich in dieser Studie um unterschiedliche Mengen-

angaben handelt, ist eine Umrechnung nötig, um die Dosierungen miteinander vergleichen zu können. In dem Modell von Tosaki et al. handelt es sich um Untersuchungen an der Langendorff-Anlage. Sie haben die Herzen mit einer Lösung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Metoprolol perfundiert. Angenommen ein Rattenherz wiegt 5 g so würde eine Konzentration von 1 μM Metoprolol (Molekulargewicht 266 g) etwa 5,32 mg/kg Herzgewicht entsprechen. Eine Signifikanz der Herzfrequenzreduktion konnte in der Studie erst ab einer Konzentration von 50 μM erreicht werden, das würde einer Dosierung von 159,6 mg/kg Körpergewicht entsprechen. Unsere Dosierung lag mit 0,25 mg/kg Körpergewicht wesentlich unter der von Tosaki et al. Dies legt den Verdacht nahe, dass unsere Dosierung von 0,25 mg/kg zu niedrig gewählt wurde.

Allerdings reduzierte in einer anderen Studie an Hunden sowohl Ivabradin als auch Atenolol in einer Dosierung von 0,25 mg/kg die HF und verbesserte die Ventrikelfunktion [Colin P et al., 2002]. Die meisten Studien verwendeten eine wesentlich höhere Dosierung dieser beiden Substanzen [Mulder P et al., 2004; Simon L et al., 1995]. Andererseits führten deutlich höhere Metoprolol-Mengen in zusätzlich von uns durchgeführten Versuchen, ebenfalls nicht zu einer signifikanten Reduktion der HF. Auch eine Studie mit Esmolol an Kaninchen konnte keinen bradykarden Effekt des β -Blockers nachweisen. Auch bei höheren Dosierungen konnte keine HF-Reduktion erzielt werden [Bel A et al., 1998]. Es könnte daher sein, dass die Dosierung allein nicht für das Ausbleiben einer negativ chronotropen Wirkung verantwortlich ist, und damit stellt sich die Frage, ob das Kaninchen eine geeignete Spezies ist. Da Kaninchen jedoch einen hohen Gehalt an β -Rezeptoren im Herzen haben [Brodde OJ et al., 1989], müssten sie für Studien mit β -Blockern geeignet sein.

Eine weitere Ursache könnte die durchaus bekannte Variabilität der HF-Senkung durch β -Adrenozeptor-Blocker sein. Das Ausmaß der negativen Chronotropie ist je nach Sympathikusaktivierung sehr unterschiedlich. Je höher der Sympathikotonus, desto besser die Wirkung [Simon L *et al.*, 1995]. Bei unseren Tieren lag vielleicht keine ausreichende Aktivierung des Sympathikus vor. Als Narkosegas haben wir Enflurane verwendet. Eine Nebenwirkung der volatilen Anästhetika ist eine Hemmung des Sympathikus. Auch wenn dieser Effekt bei Enflurane schwächer ausgeprägt ist, als bei anderen Narkosegasen, könnte dieser Effekt hier eine Rolle spielen.

Auch die Größe eines Myokardinfarkts spielt bei der Effizienz einer Therapie durch β -Blockade eine Rolle. Hu *et al.* konnten an Rattenherzen zeigen, dass die Gabe von Bisoprolol über acht Wochen bei Tieren mit einem großen Infarkt zu einer verbesserten ventrikulären Funktion geführt hat. Bei Tieren mit kleinen Infarkten konnten diese Effekte nicht nachgewiesen werden. Dies könnte daran liegen, dass bei diesen Tieren das neurohumorale System nicht in dem Ausmaß aktiviert ist, ein Umstand der zu einer erniedrigten Wirksamkeit der Substanz führt [Hu K *et al.*, 1998]. Wie weitere Untersuchungen zeigten, lagen bei unseren Tieren keine kleinen Infarkte vor (Placebo 54 ± 6 %, Metoprolol 39 ± 8 %, Ivabradin 30 ± 4 %). Die Infarktgröße bietet daher keine Erklärung für die fehlenden Effekte des Metoprolols.

5.1.2 Ivabradin

Ivabradin führt durch direkte Hemmung der Schrittmacherzellen im Sinusknoten zu einer Reduktion der HF. Eine niedrigere HF führt zu einem geringeren Sauerstoffbedarf des Myokards und zu einer Verlängerung der Diastolendauer und somit zu einer besseren koronaren Durchblutung, welche insbesondere den subendokardialen Bereichen des Myokards, die auf einen Sauerstoffmangel am empfindlichsten reagieren, zugute kommt [Guth BD *et al.*, 1987; Harron DWG *et al.*,

1982; Indolfi C *et al.*, 1989]. Aus diesen Gründen ist die Herzfrequenzreduktion in der Behandlung der Myokardischämie von größter Bedeutung. Das Ausmaß der HF-Reduktion ist von der Höhe der Dosierung abhängig. An Hunden führte die Gabe von 0,25 mg/kg zu einer HF-Reduktion von 17 %, und 0,5 oder 1 mg/kg bewirkten eine Abnahme um 21 bzw. 32 % [Colin P *et al.*, 2003].

Ivabradin werden antiischämische Eigenschaften zugesprochen. Die Limitierung der infarktinduzierten Tachykardie scheint für diesen Effekt verantwortlich zu sein. Aus der HF-Reduktion resultierte in eine bessere subendokardiale Perfusion und eine bessere regionale Ventrikelfunktion [Monnet X *et al.*, 2001]. Bei Patienten mit stabiler Angina pectoris wurden ebenfalls antianginale und antiischämische Effekte durch Ivabradin gezeigt. Der antianginale Effekt zeigte sich durch eine gesteigerte Belastungstoleranz und durch eine Abnahme der Anginaattacken. Die antiischämische Wirkung ließ sich über Veränderungen der ST-Strecken-Senkung im EKG nachweisen. Auch hier war die HF-Reduktion dosisabhängig (2,5, 5,0 oder 10,0 mg; bid) [Borer S *et al.*, 2003].

In einer Studie an Ratten bewirkte Ivabradin bereits nach einmaliger Gabe (Dosierungen von 0,1, 0,3, 3,0 und 10 mg/kg) eine signifikante Bradykardie und eine Zunahme von Aortenfluss und dP/dt_{max} . Um andauernde Effekte der Substanz zu untersuchen, wurden die hämodynamischen Daten nach vier Tagen erneut erfasst. Dabei zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede zu den akuten Ergebnissen. Es kam also innerhalb dieser Zeit zu keiner Desensibilisierung [Gardiner SM *et al.*, 1995].

Simon *et al.* bestätigten mit Versuchen an Hunden, dass Ivabradin die HF dosisabhängig reduziert, frei von negativ inotropen Effekten ist und – im Gegensatz zu Propranolol – zu keiner Konstriktion der Koronararterien führt. Allerdings war nach Ivabradin die HF-Senkung individuell sehr variabel, ein Phänomen, dass bisher nur bei β -Blockern bekannt war [Simon L *et al.*, 1995]. Die I_f -Kanäle scheinen ebenfalls

von cholinergen und adrenergen Substanzen beeinflusst zu werden. Der Grad der Sympathikusaktivität kann also auch bei Ivabradin für die Wirksamkeit von Bedeutung sein.

Die positive Auswirkung von Ivabradin auf die Herzfunktion ist aber nicht allein auf die HF-Reduktion zurückzuführen. Ein weitere positive Wirkung scheint die günstige Beeinflussung des Remodellings zu sein. Bei Ratten nach Myokardinfarkt führte die 90-tägige Ivabradin-Behandlung zu einer Besserung der ventrikulären Funktion, für die auch die Beeinflussung der myokardialen Struktur verantwortlich gemacht werden kann. Trotz einer HF-Reduktion, die erst ab einer Dosierung von 3 mg/kg signifikant war, nahm die Auswurfleistung zu. Die hämodynamischen Parameter LVP_{max} , $LV\ dP/dt_{max}$ und $LV\ dP/dt_{min}$ wurde allerdings nicht signifikant gebessert. Der Kollagengehalt des Gewebes war nach Ivabradin verringert, und die Dichte der Kapillargefäße war erhöht. Da keine Veränderung der hämodynamischen Parameter beobachtet wurde, kann die Besserung der LV-Struktur zum Teil für die gesteigerte Herzleistung verantwortlich gemacht werden [Mulder P *et al.*, 2004]. Mechanismen für die Einflussnahme auf das Remodelling könnten die Neovaskularisation und damit eine verbesserte myokardiale Blutversorgung sein. Weiterhin führt die HF-Reduktion zu einer verbesserten koronaren Perfusion. Dadurch kann eine koronare Dysfunktion verhindert werden. Eine endotheliale Dysfunktion führt zur Produktion von Zytokinen (Interleukin-1 und -6), Tumornekrosefaktoren, freien Radikalen und Endothelin. Alle Faktoren können beim Remodelling und bei der Entstehung einer Herzinsuffizienz eine Rolle spielen.

Auch wir beobachteten nach Gabe von 0,25 mg/kg Ivabradin eine Reduktion der HF um 16 %, was mit Ergebnissen aus der Literatur übereinstimmt (Tab. 3).

Tab. 3: Senkung der Herzfrequenz durch Ivabradin. Vergleichbare HF-Reduktion bei unterschiedlicher Dosierung und Spezies.

Autor	Substanz	Dosis	Spezies	Exp. Modell	HF-Red.
Simon L /1995)	Ivabradin	0,5/1 mg/kg	Hund	chronisch	16/23 %
Ragueneau I (1998)	Ivabradin	19 mg/kg	Mensch	Probanden	19 %
Vilaine J (2003)	Ivabradin	5 mg/kg	Schwein	chronisch	14 %
Borer J (2003)	Ivabradin	5/10 mg/kg	Mensch	Probanden	11/19 %
Tendera M (2003)	Ivabradin	0,25 mg/kg	Mensch	Probanden	19 %

Allerdings waren weitere Funktionsgrößen im Vergleich zu den Placeboherzen nach vier Wochen nicht verändert. Obwohl in einer Studie an Hunden Ivabradin nach Myokardinfarkt ebenfalls die hämodynamische Situation nicht signifikant verbesserte [Monnet X *et al.*, 2001], soll dieser Aspekt weiter diskutiert werden: Im akuten Versuch wurde den Tieren 0,25 mg/kg iv. verabreicht und löste einen negativ chronotropen Effekt aus. Die gleiche Dosierung oral verabreicht senkte in den vier Wochen die Herzfrequenz nicht.

Eine mögliche Erklärung könnte die Art der Verabreichung des Medikaments liefern. Bei unserer oralen Gabe könnte die Resorption von Ivabradin nicht ausreichend gewesen sein. Allerdings haben Gardiner et al. In einer Studie an Ratten Ivabradin (0,1, 0,3, 1,0, 3,0 und 10 mg/kg) subcutan, das mit einer oralen Medikation gleichwertig ist, verabreicht und erzielten dabei hämodynamische Auswirkungen sehen. So kam es zu einem Abfall der HF und des mittleren arteriellen Blutdrucks, weiterhin kam es zu einer Zunahme des Aortenflusses. Auch ein direkter Vergleich mit der intravenösen Gabe zeigte keine Unterschiede zwischen der Wirkung der subcutanen und der intravenösen Gabe [Gardiner SM *et al.*, 1995].

Eine weitere Erklärung könnte die Wahl der Dosierung geben. Auch wenn bereits Effekte bei niedrigen Dosierungen gesehen wurden [Gardiner SM *et al.*, 1995;

Colin P *et al.*, 2002], so wurden in anderen Untersuchungen auch höhere Dosierungen verwendet. Simon *et al.* z.B. erreichten erst mit einer Dosierung von 0,5 ml/kg eine signifikante Reduktion der Herzfrequenz [Simon L *et al.*, 1995]. In ihrer Studie an Ratten setzten Mulder *et al.* sogar 3 mg/kg und mehr Ivabradin ein [Mulder P *et al.*, 2004], um eine bradykarde Antwort zu erhalten. Die heute für Patienten empfohlene Dosierungen liegen bei oraler Gabe zwischen 2 und 5 mg/d.

Wir haben im Anschluss an unsere Untersuchungen zusätzliche Versuche, mit Dosierungen bis zu 1 mg/kg durchgeführt und keine negativ chronotropen Effekte erhalten. Dies spricht wiederum dafür, dass die Dosierung allein nicht die Ursache gewesen sein kann. Letzendlich können wir keine Erklärung für den Verlust der bradykarden Wirkung des Ivabradins über die vier Wochen liefern.

5.1.3 Vergleich der Substanzen

Einige andere Studien haben die Auswirkungen beider Substanzgruppen direkt miteinander verglichen. Bei Hunden zeigte sich durch Atenolol oder Ivabradin (beides 1 mg/kg; i.v.) eine gleichwertige HF-Reduktion um 30 %. Die Diastolendauer wurde durch beide Substanzen verlängert. Dieser Effekt war aber bei Ivabradin wesentlich stärker ausgeprägt. Die negative Inotropie von Atenolol scheint die Verlängerung der Diastolendauer zu limitieren [Colin P *et al.*, 2003]. Da die Diastolendauer für die subenendokardiale Perfusion von Bedeutung ist, könnte sich hieraus ein Vorteil von Ivabradin gegenüber dem Betablocker ergeben.

Vilaine *et al.* sahen ebenfalls eine gleichwertige Frequenzreduktion an Schweinen nach Myokardischämie. Beide Substanzen konnten die belastungsinduzierte Tachykardie in gleichem Maße limitieren. Der Betablocker wirkte aber im Kontrast zu Ivabradin auch negativ inotrop [Vilaine JP *et al.*, 2003]. In unserer Unter-

suchung stellten wir keine wesentlichen Unterschiede zwischen beiden Substanzen fest.

5.2 Myosin-Isoenzyme

Die Isoformen des Myosins haben zu 93 % identische Aminosäuren und sind somit in ihrem Aufbau sehr ähnlich [McNally EM *et al.*, 1989], es gibt aber wesentliche funktionelle Unterschiede. V_1 (native Form) oder α -MHC (denaturierte Form) hat eine höhere ATPase-Aktivität und Kontraktionsgeschwindigkeit als V_3 (β -MHC) und führt somit zu einer schnelleren aber unökonomischeren Kraftentwicklung. Die Zusammensetzung der Myosin-Isoformen ist für die kardiale Funktion von Bedeutung, da sie neben der Kalziumkonzentration in den Myozyten für die Kontraktilität des Myokards verantwortlich sind. Änderungen der relativen Anteile der drei Myosinisoformen V_1 , V_2 und V_3 , werden zum Teil für die veränderte Leistung des insuffizienten Herzens verantwortlich gemacht [Herron TJ *et al.*, 2001].

Im normoxischen Ventrikelmyokard eines adulten Kaninchens (16 Wochen) dominiert V_3 mit 48 %, V_1 ist mit 39 % vertreten und V_2 mit 13 % [Garcia Pomblum SC, 2002]. Diese Verteilung ist der humanen Verteilung sehr ähnlich, denn im menschlichen ventrikulären Myokard dominiert ebenfalls V_3 [Bouvagnet P *et al.*, 1984]. Durch physiologische und pathologische Faktoren wie Alter, mechanische Belastung des Herzens, Hypertonie, Schilddrüsenhormone, schlechte Ernährung [Cummins *et al.*, 1986; O'Neill L *et al.*, 1991; Morkin E, 1993; Reiser PJ *et al.*, 2001; Buttrick P *et al.*, 1991] und ventrikuläres Remodelling [Swynghedauw B *et al.*, 1989] kann die Zusammensetzung der Isoformen beeinflusst werden. Diese verschiedenen Faktoren führen zu einer Veränderung der Genexpression, so dass sich der mRNA-Gehalt ändert [Lowes B *et al.*, 1997].

5.2.1 Mechanische Faktoren

Um die Myosin-Verschiebung zu erklären, gibt es verschiedene Ansätze. Eine Möglichkeit scheint die veränderte Beanspruchung des Herzmuskels zu sein. Durch eine hämodynamische Überlastung, ob durch Volumen oder durch Druck ausgelöst, kommt es neben einer Hypertrophie zu einer Reduzierung der Kontraktionsrate. Beide Mechanismen sind physiologische Anpassungsvorgänge, um das Myokard vor der erhöhten Beanspruchung zu schützen. Die Hypertrophie hilft dem Herzen, eine physiologische Wandspannung zu erreichen. Die Abnahme der Kontraktionsrate, die einen großen Einfluss auf die kardiale Funktion hat, korreliert mit einer Abnahme der ATPase-Aktivität. V_3 benötigt für die Kontraktion weniger ATP und trägt somit zu einer ökonomischeren Arbeit des Herzens bei, daher kommt es nach einer Ischämie zu einer erhöhten Genexpression von V_3 . Die Kontraktion im Myokard, das hauptsächlich V_3 enthält, ist fünfmal ökonomischer aber auch neunmal langsamer als in Myokard das hauptsächlich V_1 enthält [Narolska NA *et al.*, 2005]. Eine Isoenzym-Verschiebung erlaubt also dem Herzen langsamer zu arbeiten und somit das Energiegleichgewicht zu bewahren [Swynghedauw B *et al.*, 1982].

Eine Erklärung für die Myosinverschiebung durch die mechanische Belastung des Herzens bietet die erhöhte Wandspannung. Diese scheint in der molekularen Regulation des α -Myosins eine Rolle zu spielen und führt zu einer Downregulation dieses Proteins [Lowes B *et al.*, 1997]. Im Kaninchenherzen führten chronische Tachykardien neben einer neurohumoralen Aktivierung zu einer Erhöhung der Wandspannung. Es kam zu einer veränderten Genexpression des Myosins und dadurch zu einem V_1 -Verlust und einer klaren V_3 -Dominanz. Obwohl eine erhöhte Wandspannung und eine neurohumorale Aktivierung Faktoren der Entwicklung einer Hypertrophie darstellen, blieb diese bei tachykardieinduzierter LV-Dysfunktion aus. Hierfür werden degradative Prozesse der kontraktilen Proteine verantwortlich

gemacht [Eble DM *et al.*, 1997]. Dies zeigt, dass der Anstieg der Herzfrequenz die Zusammensetzung der kontraktilen Proteine des Myokards beeinflussen kann. Umso wichtiger scheint es, einen Anstieg der Herzfrequenz nach Infarkt zu verhindern, um so die Myosinverschiebung beeinflussen zu können.

Der Shift in Richtung V_3 bringt zwar einen energetischen Vorteil für die Herzmuskulatur, doch hat der Verlust von V_1 auch negative Konsequenzen. Herron *et al.* untersuchten den *power output* (Kraft x Geschwindigkeit = Leistung) an Kardiomyozyten von Ratten. Dabei führten bereits geringe α -Myosin-Mengen zu einer signifikanten Steigerung der Myozyten-Leistung [Herron TJ *et al.*, 2002; Korte FS *et al.*, 2005]. Eine Studie von James *et al.* an Kaninchen mit tachykardieinduzierter Kardiomyopathie zeigte kardioprotektive Eigenschaften von V_1 , denn im Vergleich zu den Tieren, die hauptsächlich V_3 exprimierten, hatten die Tiere mit V_1 -Dominanz einen höheren systemischen Blutdruck und höhere dP/dt_{max} -Werte. dP/dt_{min} war in dieser Gruppe niedriger (-2450 ± 483 statt -2278 ± 226 mmHg/s). Alpha-Myosin scheint also die systolische und diastolische Funktion der Herzmuskulatur besser zu erhalten. Ursachen hierfür könnte die Entwicklung einer unspezifischen Hypertrophie des Myokards sein. Durch Vermehrung von Sarkomeren pro Kardiomyozyt könnte sich die Kontraktilität verbessern. Diese Vermutung wurde in dieser Studie allerdings nicht bestätigt [James J *et al.*, 2005].

In unserer Studie zeigten sich trotz der Unterschiede im V_3 -Gehalt keine Unterschiede in der Funktion. Es ist daran erinnert, dass in der Studie von James *et al.* in beiden Gruppen entweder fast 100 % V_1 oder 100 % V_3 vorlagen. Bei uns betragen die Unterschiede nur ca. 15 %. Wahrscheinlich ist dieser Unterschied zu gering, um sich in der Funktion bemerkbar zu machen. Dass ein veränderter Myosin-gehalt nicht unbedingt mit einer veränderten Funktion korrelieren muss, zeigte auch eine Studie an Ratten nach Myokardinfarkt. Trotz Einschränkung des Myosinshifts

von V1 zu V3 war die Funktion nicht verbessert [Buttrick P *et al.*, 1991]. In eine ähnliche Richtung weisen Untersuchungen von Mahaffey *et al.* [Mahaffey KW *et al.*, 1995], bei denen bei Kaninchen nach Myokardinfarkt nach Gabe eines Schilddrüsenhormonanalogs zwar die Herzfunktion verbessert, allerdings die Myosinzusammensetzung nicht verändert war. Dies bestätigt ebenfalls den Verdacht, dass die kardiale Funktions-Verbesserung nicht allein auf einen V_1 -Anstieg zurückgeführt werden kann. Es spielen offensichtlich noch andere Faktoren, wie Hormone, eine Rolle.

5.2.2 Endogene Faktoren

In dieser Studie zeigte sich die Tendenz, dass die Myosinverschiebung durch die Behandlung mit Metoprolol oder Ivabradin nicht so stark ausgeprägt war. Da wir keine Besserung der hämodynamischen Situation gesehen haben, müssen andere Mechanismen an der V_1 -Hoch-Regulation durch die Substanzen eine Rolle gespielt haben. Neben den mechanischen Ursachen des Myosinshifts werden auch Hormone für die Veränderung verantwortlich gemacht. Eine erhöhte Arbeit des Myokards, wie sie nach Ischämie beobachtet wird, ist mit einer erhöhten Neurotransmitter- und Hormonfreisetzung assoziiert. Zu den Hormonen, die einen Effekt auf die Myosin-Isoformen haben, gehören die Schilddrüsenhormone, aber auch Testosteron, Insulin, Glukokortikoide, Wachstumshormon, ANP und Norepinephrin werden diskutiert [Dillmann WH, 1984].

Katecholamine, wie Noradrenalin, scheinen für die Expression der kontraktilen Proteine eine wesentliche Rolle zu spielen. Neben direkten negativen Auswirkungen im Sinne einer Zerstörung des myokardiales Gewebes [Brown MD *et al.*, 1988] führen sie über Stimulation der α - und β -Rezeptoren zum Zellwachstum und somit zu einer Hypertrophie [Decker RS *et al.*, 1993] und steigern die Proteinsynthese. Der MHC-Gehalt wird vor allem durch Noradrenalin gesteigert, und es

kommt durch die Adrenorezeptoren zu einer verstärkten Expression von V_3 . Ob dieser Mechanismus durch die α - oder β -Rezeptoren vermittelt wird, ist letztlich nicht geklärt, aber viele Autoren machen die α -Rezeptoren dafür verantwortlich [Henning RJ *et al.*, 2000; Lee HR *et al.*, 1988]. Waspe *et al.* wiesen als erste nach, dass die Stimulation von α_1 -Rezeptoren das molekulare Signal für eine erhöhte V_3 -Expression in hypertrophierten Rattenmyozyten darstellt [Waspe LE *et al.*, 1990]. Der intrazelluläre Mechanismus, der durch Rezeptorstimulation die Proteinsynthese steigert, ist noch unbekannt. Auch wenn meist die α -Rezeptoren für den Myosinshift verantwortlich gemacht werden, so wirkt Noradrenalin sowohl auf α - als auch auf β_1 -Rezeptoren. So wäre es möglich, dass die erhöhte V_3 -Expression über α - oder auch über β -Rezeptoren vermittelt wird. Von einigen Autoren werden deshalb die β -Rezeptoren für den Myosinshift verantwortlich gemacht [Lowes BD *et al.*, 2002; Lowes BD *et al.*, 1997; Wang L *et al.*, 2002]. Diese Vermutung scheint vor allem deswegen plausibel, weil eine β -Blockertherapie zu einer Veränderung der Genexpression der kontraktilen Proteine führte. Lowes *et al.* zeigten, dass Metoprolol bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie neben einer verbesserten systolischen Funktion zu einer Hemmung des Remodellings führte. Die Myosin-Isoformen wurden ebenfalls beeinflusst. So führte Metoprolol neben einer Erhöhung der SERCA (= Calcium ATPase; für die Kontraktilität wichtiges Protein), zu einer Erhöhung der V_1 -mRNA [Lowes BD *et al.*, 2002]. Ähnliche Beobachtungen nach β -Blocker-Gabe wurden von anderen Forschungsgruppen bestätigt [Wang L *et al.*, 2002].

Auch wir zeigten, dass Metoprolol ein Einfluss auf die Isoformen hat. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass der Myosinshift in Richtung V_3 bei β -Blockertherapie nicht so stark ausgeprägt war. Der V_3 -Gehalt wurde von 78,3 % in der Placebo-Gruppe auf 63,4 % reduziert. Eine Beobachtung, die mit den Ergebnissen anderer Studie übereinstimmt. Auch die Ergebnisse der Ivabradin-Gruppe würden sich über Noradrenalin erklären lassen. Nach Hu *et al.* konnte Zatebradine den

Gehalt an links- und rechtsventrikulärem Norepinephrin senken [Hu K *et al.*, 2004]. Nach Ivabradin wurde eine ähnliche Beobachtung gemacht, denn der Noradrenalin-Plasmagehalt sank durch die Behandlung signifikant [Mulder P *et al.*, 2004]. Das erniedrigte Norepinephrin könnte den Myosinshift in Richtung V₃ einschränken.

Es erscheint schwierig, die Rolle der β -Rezeptoren isoliert zu untersuchen, da deren Stimulation fast immer mit einer mechanischen Beeinflussung einhergeht. Effekte können dann mechanische oder metabolische Ursachen haben. Lowes *et al.* haben allerdings gezeigt, dass die Metoprololtherapie bei Patienten zwar die Genexpression des Myosins veränderte aber zu keinerlei Beeinflussung des pulmonalen oder systemischen Blutdruckes führte. Auch wir haben keine hämodynamischen Unterschiede zwischen den Gruppen gesehen. Dies könnten Hinweise darauf sein, dass β -Blocker direkt auf die Genexpression wirken und nicht über mechanische Veränderungen Einfluss nehmen [Lowes BD *et al.*, 2002]. Letztendlich ist die Rolle der β -Rezeptoren in der Entstehung des Myosinshifts nicht endgültig geklärt.

Um die Beeinflussung des Myosinshifts durch die Katecholaminkonzentration und -wirkung zu beurteilen, müsste der Noradrenalingehalt bestimmt werden. Leider wurde er in der vorliegenden Studie nicht bestimmt.

Die verbreitete Hypothese, dass Hormone auf den Myosinshift Einfluss nehmen, ist nicht generell akzeptiert. Imamura *et al.* beobachteten, dass der Isoenzymshift nach hämodynamischer Belastung eine lokale Antwort war und nicht durch intrinsische Faktoren, z.B. von Hormonen, beeinflusst wurde. In ihrem eleganten Modell belasteten die Autoren die Ventrikel unabhängig voneinander, und konnten so zeigen, dass sich die Genexpression nur im betroffenen Ventrikel veränderte [Imamura S *et al.*, 1990].

5.2.3 Andere Medikamente

Eine Beeinflussung des Remodellings und der Myosin-Isoformen (Bestandteil des Remodellings) durch andere Medikamente ist schon länger bekannt. Sie erzielen diesen Effekt auf sehr unterschiedliche Weise.

ACE-Hemmer. Für ACE-Hemmer ist die Wirkung am besten beschrieben. An Ratten kam es vier Wochen nach Myokardinfarkt zu einer Downregulation von V_1 . Vor dem Infarkt dominierte α -MHC mit über 90 %. Nach dem Infarkt war es nur noch mit 50 % vertreten. Die Behandlung mit dem ACE-Hemmer Imidapril konnte diesen Myosinshift teilweise verhindern. Dabei war der Proteingehalt des Gewebes konstant, so dass ein Verlust von V_1 durch Proteolyse ausgeschlossen werden konnte. Die veränderte Isoenzym-Zusammensetzung kommt durch eine veränderte Genexpression zustande, was Messungen der mRNA bestätigten [Wang J *et al.*, 2002]. Als Ursache des Einflusses auf das Remodelling wird vor allem die Blockade des Renin-Angiotensin-Systems mit seinen Auswirkungen auf die Hämodynamik angesehen. Imidapril führte zu einer Senkung der Nachlast und der Vorlast (enddiastolischer Druck). Durch die Abnahme der Nachlast, wird die LV-Funktion verbessert, und über die Abnahme der pulmonalen Hypertonie (Reduktion von LVP_{ed}), wird die RV-Funktion verbessert. Beide Mechanismen werden als Ursache für die veränderte Isoform-expression angesehen. ACE-Hemmer haben aber auch eine direkte Wirkung auf myokardiales Gewebe und hemmen so das durch Angiotensin II induzierte Zellwachstum und die erhöhte Proteinsynthese [Weber KT, 1997; Schunkert H *et al.*, 1995].

Angiotensin-II-Rezeptorantagonisten. Diese Medikamente limitieren ebenfalls den Myosinshift. Sie blockieren den AT_1 -Rezeptor und hemmen so die Effekte von Angiotensin II. Es kommt zur Vasodilatation und zu einer verminderten Aldosteron-

sekretion. Auch hier kann man, wie bei den ACE-Hemmern, von einer Blockierung des Renin-Angiotensin-Systems sprechen. Studien haben gezeigt, dass z.B. Losartan den Myosinshift nach einem Myokardinfarkt hemmen konnte [Wang J *et al.*, 2004]. Das Ausmaß des Myosinshift in Richtung auf V_3 scheint mit der Größe der Infarktnarbe zu korrelieren. Bei Tieren mit großen Infarkten war der Shift stärker ausgeprägt als bei Tieren mit kleinen Infarkten. Losartan löste mehrere Mechanismen aus, die für die Limitierung des Myosinshifts verantwortlich gemacht werden: es reduzierte die Infarktgröße, die Wandspannung, die Inzidenz der Herzinsuffizienz und die Hypertrophie. Es liegt also eine Kombination der hämodynamischen Effekte mit Effekten vor, die durch eine direkte Wirkung auf Rezeptoren das Zellwachstum hemmen [Zhang ML *et al.*, 2003]. Aldosteronantagonisten wie Eplerone verstärken den positiven Effekt der Angiotensin-II-Antagonisten auf den Remodellingprozess und die Myosinexpression, indem sie die Hochregulation der ACE mRNA verhindern [Fracarollo D *et al.*, 2005].

Da die Infarktgröße eine Rolle zu spielen scheint, würde Ivabradin in dieser Hinsicht einen Vorteil bringen. Es reduzierte ebenfalls die Infarktgröße und könnte somit zu einer Limitierung der Myosin-Isoenzym-Veränderung führen. In der hier vorliegenden Studie reduzierte Ivabradin den V_3 -Gehalt von 78,3 % auf 61,7 %.

Erythropoetin (EPO). Dieses hämatopoetische Hormon scheint ebenfalls Auswirkungen auf die Verteilung der Myosin-Isoformen zu haben. Die Hauptfunktion von EPO ist die Steuerung der Proliferation und der Differenzierung der Erythrozytenvorläuferzellen im Knochenmark. Da es aber auch außerhalb des hämatopoetischen Systems EPO-Rezeptoren gibt, z.B. in den Kardiomyozyten, kommt es zu zusätzlichen Effekten des Hormons. So kann es bei einem akuten Myokardinfarkt die Infarktgröße reduzieren und führt durch Neovaskularisation zu einer besseren Blutversorgung des infarzierten Myokards führen. Für die Kardioprotektion bei einem

akuten Ereignis wird ein antiapoptotischer EPO-Effekt verantwortlich gemacht. Die Protektion des Herzens wird aber auch nach einem Infarkt beobachtet. EPO-Gabe nach Infarkt führte an Ratten zu einer Senkung der V_3 -Expression und zu einer verbesserten kardialen Funktion (Erhöhung von LVP, Senkung von LVP_{ed}). Für den Einfluss auf die Myosinexpression wird vor allem die Neovaskularisation verantwortlich gemacht [van der Meer P *et al.*, 2005]. Bei bradykarden Substanzen wurden ähnliche Effekte beobachtet. Alinidin führte durch Herzfrequenzreduktion nach Myokardinfarkt zu einer Angiogenese, die durch den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor vermittelt wurde. Durch die Stimulation der Angiogenese wurde die Koronarreserve verbessert und der Remodellings-Prozess wurde limitiert [Lei L *et al.*, 2004]. Für Ivabradin wäre ein entsprechender Mechanismus denkbar. Käme es durch Ivabradin zur Angiogenese, könnten damit die Myosin-Isoenzyme und ihre Verteilung günstig beeinflusst werden. Allerdings haben wir keine andauernde Herzfrequenzreduktion erzielen können.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass viele unterschiedliche Medikamente auf die Myosinexpression einflussnehmen. Dabei handelt es sich meist um indirekte Effekte die durch eine bessere Hämodynamik oder eine verbesserte Sauerstoffversorgung erreicht wurden.

5.2.4 Regionale Unterschiede

Es gibt Untersuchungen in denen je nach Region der V_1 -Gehalt im normoxischen Myokard des Kaninchens variiert. Dabei findet sich im rechten Ventrikel ein höherer V_1 Anteil als im linken Ventrikel. Dieser Unterschied ist mit 5 % gering aber statistisch signifikant. Eine Erklärung dafür liefert die unterschiedliche Druckbelastung der Ventrikel: der linke Ventrikel baut einen wesentlich höheren Druck auf als der rechte. Da Druckbelastung bekanntlich für eine Verschiebung in Richtung auf

V₃ verantwortlich gemacht werden kann, liegt nahe, dass der V₃-Gehalt im linken Ventrikel höher ist [Litten RZ *et al.*, 1985]. Wir beobachteten keine signifikanten Unterschiede in der Isoformzusammensetzung zwischen dem rechten und dem linken Ventrikel. Unsere Ergebnisse korrelieren mit früheren Untersuchungen [Lowes BP *et al.*, 1997; Yokota N *et al.*, 1995], die ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ventrikeln gesehen haben. Andererseits wurden auch geringe Unterschiede zwischen beiden Ventrikeln berichtet, die bei 7 bzw. 5 % lagen [Wang J *et al.*, 2002; Mercadier JJ *et al.*, 1981]. Wieder andere Studien berichten sogar von großen Unterschieden zwischen dem rechten und dem linken Ventrikel (LV: 62 % V₃, RV: 86 % V₃) [Devor S *et al.*, 1998]. Imamura *et al.* konnten an Rattenherzen zeigen, dass die veränderte Genexpression der Isoenzyme durch Druckbelastung des Herzens eine lokale und keineswegs eine generelle Antwort auf eine kardiale Belastung ist. So fanden sich in ihren Untersuchungen nur im betroffenen Ventrikel Veränderungen der Isoformen [Imamura S *et al.*, 1990]. Eine mögliche Erklärung sind die unterschiedlichen Ursachen für einen Myosinshift. Mechanische Ursachen scheinen zu einer lokalen Veränderung der Zusammensetzung zu führen, wohingegen intrinsische Faktoren wie Hormone zu einer generellen Veränderung führen. Dies würde auch unsere Ergebnisse erklären, da in unserer Studie von hormonalen Ursachen für den Myosinshift ausgegangen werden muss.

Die Unterschiede in der Myosinzusammensetzung zwischen den Spezies sind groß. Das Kaninchen ähnelt in der Hinsicht dem Menschen und ist daher für Untersuchungen der Myosin-Isoenzyme gut geeignet [James J *et al.*, 2005].

5.3 BNP

Bei einer Herzinsuffizienz werden einige neurohumorale Faktoren aktiviert. Es kommt zu einem Anstieg der Plasmakonzentrationen von Noradrenalin, ANP,

BNP und zu einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems. Von diesen Faktoren scheint das BNP die größte Aussagekraft über die linksventrikuläre Funktion und Prognose zu haben. Die BNP-Konzentration im Plasma ist bei verschiedenen Herzerkrankungen erhöht. Dabei führen unterschiedliche Faktoren zu einem Anstieg der BNP-Konzentration. Eine erhöhte Dehnung der Ventrikel wird als Stimulus für eine gesteigerte Peptidsekretion angesehen. Dabei steigt die BNP-Freisetzung mit der ventrikulären Volumenzunahme, der Druckbelastung und der daraus resultierenden erhöhten Wandspannung als kompensatorische Antwort proportional an [Tsutamoto T *et al.*, 1997]. Die Plasma-BNP-Spiegel sind bereits angestiegen, bevor eine Herzinsuffizienz klinisch symptomatisch wird.

Der BNP-Plasma-Spiegel wird aber nicht nur durch mechanische Größen beeinflusst. Vielmehr spielen auch Hormone eine Rolle. Adrenalin, Angiotensin II und Endothelin 1 können unabhängig von ihren mechanischen Auswirkungen die Expression von ANP und BNP verändern [Iso T *et al.*, 1997].

Bei Kaninchen ist der BNP-Gehalt unter normalen Bedingungen sehr gering. Bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz steigt die BNP-Konzentration deutlich an. Dabei lässt sich der Anstieg durch eine erhöhte Wandspannung, als Ausdruck einer linksventrikulären Überlastung, erklären [Luchner A *et al.*, 2001]. Auch nach einem Myokardinfarkt steigt die Plasmakonzentration an. Das Ausmaß des des BNP-Anstieges korreliert mit dem Schweregrad der Ischämie [Sabatine MS *et al.*, 2004], der BNP-Gehalt hat also eine prognostische Potenz. Je höher die BNP-Werte, desto wahrscheinlicher ist das Auftreten einer Herzinsuffizienz, und auch die Mortalität und die Wahrscheinlichkeit eines Reinfarkts korrelieren mit dem BNP-Gehalt. Das ist verständlich, wenn man bedenkt, dass der BNP-Gehalt das Ausmaß der kardialen Dysfunktion widerspiegelt [Richards AM *et al.*, 2003].

Natriuretische Hormone beeinflussen das kardiale Remodelling indem sie vor allem die Entwicklung der Fibrose hemmen. Das Myokard reagiert auf pathologische

Bedingungen mit einer Zellproliferation der Fibroblasten und mit einer erhöhten Kollagenproduktion. Dies führt zu einer erhöhten Steifigkeit des Herzmuskels und dadurch zu einer diastolischen Dysfunktion, aus der eine Herzinsuffizienz resultiert. BNP kann die Entstehung der Fibrose und Hypertrophie nach Myokardinfarkt hemmen. Dabei hemmt es die Wirkung von TGF- β , ein Faktor der im großen Maße zur Fibroseentstehung beiträgt [Kapoun AM *et al.*, 2004]. Auch für C-natriuretisches Peptid konnten ähnliche Effekte beobachtet werden, welches so die kardiale Funktion verbessert [Soeki T *et al.*, 2005].

In unserer Studie stiegen die BNP-Konzentrationen in allen Gruppen außer der Sham-Gruppe nach Ligatur an. Dieser Anstieg war in der Placebo-Gruppe signifikant, was nahelegt, dass sowohl Metoprolol als auch Ivabradin einen, wenn auch begrenzten, protektiven Effekt auslösten. Dies weist darauf hin, dass es durch die Medikamente zu kleinen Veränderungen in der Volumen- und Druckbelastung gekommen sein muss. Weiterhin deutet es darauf hin, dass die Expression der Myosinisoformen und die BNP-Anstiege in einem gewissen Umfang miteinander korrelieren. Diese Beobachtung steht im Widerspruch mit einer Untersuchung an herzinsuffizienten Patienten mit β -Blocker-Therapie, in welcher sich kein Zusammenhang zwischen der BNP-Konzentration und der Myosinexpression zeigen ließ [Yasumura Y *et al.*, 2003]. Auch eine Untersuchung an Ratten zeigte, dass Veränderungen in der Myosinexpression unabhängig von der BNP-Konzentration auftreten können [Yokota N *et al.*, 1995].

5.4 Infarktgröße

Die Infarktgröße in den beiden therapierten Gruppen war signifikant kleiner als in der Placebogruppe. Es fällt auf, dass die Ventrikelfunktion bei derart großen Infarkten auch nach vier Wochen noch überraschend gut erhalten war. Beide

Medikamente führten also zu einer Reduktion der Infarktgröße. Dieses müsste sich eigentlich in der Funktion bemerkbar machen. Änderungen bei den hämodynamischen Parametern blieben allerdings aus. Obwohl es sich bei unseren Infarkten um große Infarkte handelt sind die Tiere nicht insuffizient geworden.

5.5 Mortalität

Es besteht ein Zusammenhang zwischen Herzfrequenz und Mortalität. Eine erhöhte Herzfrequenz ist ein Marker für ein erhöhtes Risiko für die allgemeine Mortalität [Singh BN, 2001].

In unserer Studie lag die Mortalität nach Koronarligatur und Medikamentengabe in der Placebogruppe bei 55 %. Eine vergleichbare Mortalitätsrate ergab sich in einer anderen Studie an New Zealand White Kaninchen, in welcher die Mortalitätsrate nach Ligatur einer Koronararterie bei 60 % lag [Edwards R *et al.*, 2002]. Die Mortalität in der Metoprolol- und in der Ivabradin-Gruppe lag mit 18 bzw. 27 % deutlich niedriger.

Dass β -Blocker einen positiven Einfluss auf die Mortalität haben, ist aus der Literatur hinreichend bekannt. Dies scheint sowohl bei ischämischen Herzerkrankungen [Gundersen T *et al.*, 1989; Hjalmarson A *et al.*, 1990; Hjalmarson A, 1998;], als auch bei chronischer Herzinsuffizienz [Lechat P *et al.*, 2001] auf die Herzfrequenzreduktion zurückzuführen zu sein. Hjalmarson *et al.* zeigten eine signifikante Reduktion der Sterblichkeit nach Metoprololgabe [Hjalmarson A *et al.*, 1981]. Trotz unserer niedrigen Dosierung (= 0,25 mg/kg/d) der Medikamente, erzielten wir eine Reduktion der Mortalität. Daten hinsichtlich der Mortalität bei Kaninchen nach Ivabradin-Gabe ließen sich in der Literatur nicht finden.

5.6 Kritik der Methode

Insuffizienz und Infarktgröße. Ein zentraler Kritikpunkt dieser Studie ist, dass wir keine herzinsuffizienten Tiere haben. Die Definition der Herzinsuffizienz nach WHO lautet: Unfähigkeit des Herzens, Blut oder Sauerstoff in einem Maße zu transportieren, welches den Bedürfnissen des Organismus gerecht wird. Auffallend war, dass sich die Funktion der Herzen nach vier Wochen zwischen den einzelnen Gruppen nicht unterschied. Daraus schließen wir, dass das Setzen der Myokardischämie bei den Tieren zu keiner Herzinsuffizienz geführt hat. Zumindest lag zu dem Zeitpunkt nach vier Wochen keine Insuffizienz vor. Wir gehen davon aus, dass sich die Herzen zu diesem Zeitpunkt in einer Phase des Remodellings befanden, in der der Verlust des infarzierten Gewebes noch kompensiert werden konnte. Hätte man länger gewartet wären die Kaninchen wahrscheinlich herzinsuffizient geworden. Die Infarktgröße kann nicht die Ursache sein, da bei unseren Tieren große Infarkte vorlagen (Placebo $54 \pm 6 \%$, Metoprolol $39 \pm 8 \%$, Ivabradin $30 \pm 4 \%$). Hätten wir noch größere Infarkte gesetzt wären unsere Kaninchen wahrscheinlich verstorben. Das ist ein bekanntes Phänomen bei dieser Spezies. Bei Ratten werden in Studien oft große Infarkte gesetzt ($>40 \%$), ohne dass die Tiere sofort versterben. Kaninchen hingegen würden solche großen Infarkte gar nicht erst überleben. Ursache hierfür könnte eine unterschiedliche Anatomie der Koronarien oder eine andere Kollateralversorgung in der postischämischen Phase sein [Mahaffey KW *et al.*, 1995]. In unserer Studie bestätigte sich diese Beobachtung. Kaninchen mit noch größeren Infarkten verstarben meist in der postischämischen Phase.

Der Myosinshift in Richtung auf V_3 scheint aber nicht vom Vorhandensein einer Herzinsuffizienz, wie sie nach großen Infarkten zu beobachten ist, abhängig zu sein. Er findet sich auch bei unkomplizierten Infarkten ohne hämodynamische Konsequenzen. Allerdings ist dann der Shift nicht so stark ausgeprägt [Zhang ML *et al.*,

2003]. Dies würde unsere Ergebnisse erklären: Wir beobachteten zwar einen deutlichen Shift, der allerdings nicht so stark ausgeprägt war, wie in anderen Untersuchungen, in denen der V₃ Gehalt meist über 90 % lag [Eble DM *et al.*, 1997, Lowes BD *et al.*, 1997].

Endogene Faktoren. In der Entstehung des Myosinshifts spielen nicht nur mechanische sondern auch endogene Faktoren wie Hormone eine Rolle. In dieser Untersuchung wurde nur BNP gemessen. Andere Hormone wie Schilddrüsenhormone, die den größten Einfluss auf die Myosin-Isoformen haben, ANP, Noradrenalin, Glukokortikoide und Insulin wurden nicht bestimmt. Vielleicht hätte sich hier ein Zusammenhang zwischen der Medikamentengabe und den Hormonspiegeln gezeigt, was wiederum unsere Shiftveränderung erklären könnte.

Myosin-Isoenzyme. Die Anzahl der Versuchstiere lag bei den Myosinuntersuchungen bei n=3 oder n=4 pro Gruppe. Diese Anzahl ist zu klein, um eine statistische Signifikanz zu erzielen. Daher können wir bei unseren Ergebnissen nur von Tendenzen sprechen, auch wenn die Unterschiede zwischen den Gruppen deutlich waren.

Bei der hier verwendeten Methode werden die relativen Anteile der Isoformen und nicht die absoluten Proteinmengen bestimmt. So ist eine Aussage darüber nicht möglich, ob es zu einer erhöhten oder erniedrigten Proteinsynthese gekommen ist.

Weiterhin wurde diese Methode nicht direkt mit der SDS-Methode (denaturierte Bedingungen) verglichen, die als Goldstandard gilt. Allerdings stimmen unserer Ergebnisse mit der Methode unter nativen Bedingungen mit vergleichbaren Studien überein [Reiser PJ und Kline WO, 1998; Mahaffey KW *et al.*, 1995; Litten *et al.*, 1985].

Dosierung. Ein zentraler Kritikpunkt dieser Studie ist die Dosierung von Metoprolol und Ivabradin. Die relative niedrige Metoprolol-Dosis wurde gewählt, um die ventrikuläre Funktion nach Ligatur nicht zu verschlechtern. Durch dieses Vorgehen wurde die Herzfrequenz nur moderat gesenkt. Ivabradin entwickelte zwar bei der Operation direkt nach Gabe einen bradykarden Effekt, doch war im weiteren Verlauf der Studie und vor allem bei den Messungen nach vier Wochen die HF gegenüber den anderen Gruppen nicht reduziert. Vielleicht lag das an der oralen Gabe des Medikaments. Es könnte sein, dass die Resorption nicht ausreichend war und somit ein zu niedriger Ivabradin-Plasmaspiegel vorlag. Sporadische Messungen der Herzfrequenz während der vier Wochen wurden nicht durchgeführt.

6 Zusammenfassung und Schlussfolgerung

In der hier verwendeten Dosierung von 0,25 mg/kg führte der β -Blocker Metoprolol zu keiner signifikanten Herzfrequenzsenkung oder zu anderen hämodynamischen Auswirkungen. Ivabradin hingegen senkte während der Operation die HF um 16 %. Nach vierwöchiger Behandlung konnte für beide Substanzen keine HF-Reduktion oder Veränderung der anderen hämodynamischen Parameter beobachtet werden. Positive Effekte der beiden Substanzen zeigten sich aber in der Infarktgröße und der Mortalität. Beide Medikamente konnten die Infarktgröße und die Mortalität senken.

Bei den Myosin-Isoformen zeigte sich, dass die Behandlung mit Metoprolol und Ivabradin den Trend zeigte, den Myosinshift zu limitieren. Da keine mechanischen Veränderungen zu beobachten waren, müssen andere Faktoren den Myosinshift gehemmt haben. Der Norepinephringehalt, die Infarktgröße, direkte Wirkungen auf Myozyten oder eine Neovaskularisation durch Ivabradin bieten mögliche Erklärungen für unsere Beobachtungen. Die veränderte Myosinexpression korrelierte mit der BNP-Konzentration. Daraus schließen wir, dass die Expression der Myosin-Isoenzyme multifaktoriell geregelt ist. Neben mechanischen Faktoren spielen endogene Prozesse eine Rolle. Im direkten Vergleich der beiden Substanzen zeigten sich keine Vorteile von Ivabradin gegenüber Metoprolol. Beide Substanzen zeigten keine Besserung der kardialen Funktion aber führten zu einer Limitierung des Myosinshifts. Ivabradin und Metoprolol scheinen den Prozess des Remodellings auf dem Niveau der Myosin-Isoenzyme zu hemmen.

7 Literatur

Abraham WT, Gilbert EM, Lowes BD, Minobe WA, Larrabee P, Roden RL, Dutcher D, Sederberg J, Lindenfeld JA, Wolfel EE, Shakar SF, Ferguson D, Volkmann K, Linsemann JV, Quaife RA, Robertson AD, Bristow MR. Coordinate changes in myosin heavy chain isoform gene expression are selectively associated with alterations in dilated cardiomyopathy phenotype. *Mol Med* 2002;8:750-760.

Alpert NR, Mulieri LA, Litten RZ. Functional significance of altered myosine adenosine triphosphatase activity in enlarged hearts. *Am J Cardiol* 1979;44:947-953.

Alpert NR, Mulieri LA. The functional significance of altered tension dependent heat in thyrotoxic myocardial hypertrophy. *Basic Res Cardiol* 1980;75:179-184.

Alpert NA, Brosseau C, Frederico A, Krenz M, Robbins J, Warshaw DM. Molecular mechanics of mouse cardiac myosin isoforms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283:H1446-H1454.

Altman PL and Dittmer DS. Biology Data Book. 2. ed., Volume III, Biological handbooks 1974, Bethesda.

Australia-New Zealand Heart Failure Research Collaborative Group. Effects of carvedilol, a vasodilator- β -blocker, in patients with congestive heart failure due to ischemic heart disease. *Circulation* 1995;92:212-218.

Bauman JL, Talbert RL. Pharmacodynamics of beta-blockers in heart failure: lessons from the carvedilol or metoprolol European trial. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2004 Jun;9(2):117-28.

Bel A, Perrault L, Faris B, Vilaine JP, Menasche P. Inhibition of the pacemaker current: a bradycardic therapy for off-pump coronary operations. *Ann Thorac Surg* 1998;66:148-152.

Borer S, Fox K, Jaillon P, Lerebours G. Antangial and antiischemic effects of ivabradine, an I_f inhibitor, in stable angina. *Circulation* 2003;107:817-823.

Bortone AS, Hess OM, Gaglione A, et al. Effect of propranolol on coronary vasomotion in response to sympathetic stimulation in humans: importance of the functional integrity of the endothelium. *Circulation* 1990;81:1225-1235.

Bouvagnet P, Leger J, Pons F, deschesne C, Leger JJ. Fiber types and myosin types in human atrial and ventricular myocardium: An anatomical description. *Circ Res* 1984;55:794-804.

Bredford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.

Brodde OJ. β adrenoceptors. In: Williams M, Glennon RA, Timmermans PBMWM, eds. Receptor pharmacology and function. New York: Marcel Dekker, 1989;207-43.

Brown MD, Hudlicka O. Protective effects of long-term bradycardial pacing against catecholamine-induced myocardial damage in rabbit hearts. *Circ Res* 1988;62:965-974.

Buttrick P, Malhotra A, Factor S, Geenen D, Leinwand L, Sccheuer J. Effect of aging and hypertension on myosin biochemistry and gene expression in the rat heart. *Circ Res* 1991;68:645-652.

Colin P, Ghaleh B, Hittinger L, Monnet X, Slama M, Giudicelli JF, Berdeaux A. Differential effects of heart rate reduction and β -blockade on left ventricular relaxation during exercise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;282:H672-H679.

Colin P, Galeh B, Monnet X, Hittinger L, Guidicelli JF, Berdeaux A. Contributions of heart rate and contractility to myocardial oxygen balance during exercise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284(2):H676-H682.

Colin P, Ghaleh B, Monnet X, HittingerL, BerdeauxA. Effect of graded heart rate reduction with ivabradine on myocardial oxygen consumption an diastolic time in exercising dogs. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;308:236-240.

Collins R. Placebo-controlled trial of early metoprolol in 46.000 acute myocardial infarction patients. ACC, Orlando. 2005.

Cummins P, Lambert SJ. Myosin transitions in the bovine and human heart. A development and anatomical study of heavy and light chain subunits in the atrium and ventricle. *Circ Res* 1986;58:846-858.

Davidson NC, Struthers AD. Brain natriuretic peptides. *J Intern Med* 1994;235:561-76.

Decker RS, Cook MG, Behnke-Barclay MM, Decker ML, Lesch M, Samarel AM. Catecholamines modulate protein turnover in cultured, quiescent rabbit cardiac myocytes. *Am J Physiol* 1993;265:H329-H339.

de Lemos JA, McGuire DK, Drazner MH. B-type natriuretic peptide in cardiovascular disease. *Lancet* 2003;363:316-322.

Devor S, Opitck J, Boluyt M, White T. Regional differences in myosin heavy chain phenotype of young, dault, and aged female rats. *Med Sci Sport Exerc* 1998;30:S15.

DiFrancesco D, Camm JA. Heart Rate Lowering by specific and selective I_f Current inhibition with Ivabradine. *Drugs* 2004;64(16):1757-65.

Dillmann WH. Hormonal influences on cardiac myosin ATPase activity and myosin isoenzyme distribution. *Mol Cell Endocrinol* 1984;34:169-181.

Eble, DM, Walker JD, Mukherjee R, samarel AM, Spinale FG. Myosin heavy chain synthesis is increased in a rabbit model of heart failure. *Am J Physiol* 1997;72:H969-978.

Edwards R, Yousef Z, Rakhit R, Wright M, Rosenthal E, Redwood S, Marber M. A model of closed chest regional myocardial infarction in the rabbit: a clinically relevant in vivo assay system of post-infarction remodelling. *Basic Res Cardiol* 2002;97:374-383

Feuerstein G, Liu GL, Yue TL, Cheng HY, Hieble JP, Arch JR, Ruffolo RR, Ma XL. Comparison of metoprolol and cervedilol pharmacology and cardioprotection in rabbit ischemia and reperfusion model. *Eur J Pharmacol* 1998;351:341-350.

Fishbein MC, Lei LQ, Rubin SA. Long-term propranolol administration alters myocyte and ventricular geometry in rat heart with and without infarction. *Circulation* 1988;78:369-375.

Fraccarollo D, Galuppo P, Schmidt I, Ertl G, Bauersachs J. Additive amelioration of left ventricular remodeling and molecular alterations by combined aldosterone and

angiotensin receptor blockade after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2005; 67:97-105.

Freitag MH, Larson MG, Levy D, Benjamin EJ, Wang TJ, Leip EP, Wilson PW, Vasan RS. Framingham heart study: Plasma brain natriuretic peptide levels and blood pressure tracking in the Framingham heart study. *Hypertension* 2003;41:978-983.

Garcia Pomblum SC. Myosin heavy chain (MHC) isoenzymes: A new method for analysis and aspects of their heterogeneous distribution in normoxic and post-ischemic hearts. 2002; Dissertation, Universität Düsseldorf.

Gardiner SM, Kemp PA, March JE, Bennett T. Acute and chronic cardiac and regional haemodynamic effects of the novel bradycardiac agent, S16257, in conscious rats. *Br J Pharmacol* 1995;115:579-586.

Granetzny A, Schwanke U, Schmitz-Spanke S, Arnold G, Schäfer D, Schulte HD, Gams E, Schipke JD. Pharmacological heart rate reduction: effect of a novel specific bradycardiac agent on isolated, blood-perfused rabbit hearts *Thorac Cardiovasc Surgeon* 1998;46:63-69.

Gundersen T, Grottum P, Pedersen T (1989) Effect of timolol on mortality and reinfarction after acute myocardial infarction: prognostic importance of heart rate at rest. *Am J Cardiol* 1989;58:20-24

Guth BD, Heusch G, Seitelberger R, Matsuzaki M, Ross J. Role of heart rate reduction in the treatment of exercise-induced myocardial ischaemia. *Eur Heart J* 1987;8:61-68.

Harron DWG, Jady K, Riddell JG, Shanks RG. Effects of alinidine, a novel bradycardic agent, on heart rate and blood pressure in man. *J Cardiovasc Pharmacol* 1982;4:213-220.

Herron TJ, Korte FS, MyDonals KS. Loaded shortening and power output in cardiac myocytes are dependent on myosin heavy chain isoform expression. *Am J Physiol* 2001;281:H1217-H1222.

Herron TJ, McDonald KS. Small amounts of alpha-myosin heavy chain isoform expression significantly increase power output of rat cardiac myocyte fragments. *Circ Res* 2002;90:1150-1152.

Heilbrunn SM, Shah P, Bristow MR, Valantine HA, Ginsburg R, Fowler MB. Increased β -receptor density and improved hemodynamic response to catecholamine stimulation during long-term metoprolol therapy in heart failure from dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1989;79:4873-490.

Henning RJ, Silva J, Reddy V, Kamat S, Morgan MB, Li YX, Chiou S. Cocaine increases beta-myosin heavy-chain protein expression in cardiac myocytes. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2000;5(4):313-322.

Hjalmarson A, Elmfeldt D, Herlitz J, Holmberg S, Malek I, Nyberg G, Ryden L, Swedberg K, Vedin A, Waagstein F, Waldenstrom A, Waldenstrom J, Wedel H, Wilhelmsen L, Wilhelmsen C. Effect on mortality of metoprolol in acute myocardial infarction a double blind randomized trial. *Lancet* 1981;2:823-827.

Hjalmarson A, Gilpin EA, Kjekshus J, et al. Influence of heart rate on mortality after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1990;65:547-53.

Hjalmarson A. Effects of beta blockade on sudden cardiac death during acute myocardial infarction and the postinfarction period. *Am J Cardiol* 1997; Nov 13;80 (9B):35J-39J.

Hjalmarson A. Significance of reduction in heart rate in cardiovascular disease. *Clin Cardiol* 1998;21(12 Suppl. II):II3-7.

Hoh JFY, Yeoh GPS, Thonas MAW, Higgin L. Structural differences in the heavy chains of rat ventricular myosin isoenzymes. *FEBS Letters* 1997;97:330-334.

Hu K, Gaudron P, Ertl G. Long-term effects of beta-adrenergic blocking agent treatment on hemodynamic function and left ventricular remodeling in rats with experimental myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:692-700.

Hu K, Naumann A, Fraccarollo D, Gaudron P, Kaden J, Neubauer S, Ertl G. Heart rate reduction by zatebradine reduces infarct size and mortality but promotes remodelling in rats with experimental myocardial infarction. *AM J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286:1281-1288.

Hunt PJ, Nicholls MG, et al. Immunoreactive aminoterminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP): a new marker of cardiac impairment. *Clin Endocrinol* 1997; 47:287-296.

Imamura S, Matsuoka R, Hiratsuka E, Kimura M, Nishikawa, Takao A. Local response to cardiac overload on myosin heavy chain gene expression and isozyme transition. *Circ Res* 1990;66:1067-1073.

Indolfi C, Guth BD, Miura T, Miyazaki S, Schulz R, Ross J. Mechanisms of improved ischemic regional dysfunction by bradycardia. Studies on UL-FS 49 in swine. *Circulation* 1989;80:983-993.

Indolfi C, Ross J Jr, The Role of heart rate in myocardial ischemia and infarction: implications of myocardial perfusion-contraction matching. *Prog Cardiovasc Dis* 1993;36:61-74.

Iso T, Arai M, Wada A, Kogure K, Suzuki T, Nagai R. Humoral factors produced by pressure overload enhance cardiac hypertrophy and natriuretic peptide expression. *Am J Physiol* 1997;273:H113-H118.

Jain P, Lillis O, Cohn PF. Effects of metoprolol on early infarct expansion after acute myocardial infarction. *Am Heart J* 1994;127:764-773.

James J, Martin L, Krenz M, Quatman C, Jones F, Klevitsky R, Gulick J, Robbins J. Forced expression of alpha-myosin heavy chain in the rabbit ventricle results in cardioprotection under cardiomyopathic conditions. *Circulation* 2005;111:2339-2346.

Kapoun AM, Liang F, O`Young G, Damm DL, Quon D, White RT, Munson K, Lam A, Schreiner GF, Protter AA. B-type natriuretic peptide exerts broad functional opposition to transforming growth factor- β in primary human cardiac fibroblasts. *Circ Res* 2004;94:453-461.

Katz AM, Physiology of the heart. *Raven Press*, New York, 1992.

Korte FS, Herron TJ, Rovetto MJ, MyDonald KS. Power output is linearly related to MyHC content in rat skinned myocytes and isolated working hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289(2):H801-H812.

Krenz M, Robbins J. Impact of beta-myosin heavy chain expression on cardiac function during stress. *J Am Coll Cardiol* 2004;44(12):2390-2397.

Lechat P, Packer M, Chalon S, et al. Clinical effects of β -adrenergic blockade in chronic heart failure: a meta-analysis of double-blind, placebo-controlled, randomized trials. *Circulation* 1998;98:1183-1191.

Lechat. Beta-blocker treatment in heart failure. Role of heart rate reduction. *Basic Research Cardiol* 1998;93:148-155.

Lee HR, Henderson AS, Reynolds R, Dunmon P, Yuan D, Chien KR: α 1-Adrenergic stimulation of cardiac gene transcription in neonatal rat myocardial cells. *J Biol Chem* 1988;263:7352-7358.

Lei L, Zhou R, Zheng W, Christensen LP, Weiss RM, Tomanek RJ. Bradycardia induces angiogenesis, increase coronary reserve, and preserves function of the postinfarcted heart. *Circulation* 2004;110:796-802.

Levy D, Garrison RJ, Savage DD, et al. Left ventricular mass and incidence of coronary heart disease in an elderly cohort. The Framingham heart study. *Ann Intern Med* 1989;110:101-107.

Levy D, Garrison RJ, Savage DD, et al. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham heart study. *N Engl J Med* 1990;322:1561-1566.

Litten RZ, Martin BJ, Buchthal RH, Nagai R, Low RB, Alpert NR. Heterogeneity of myosin isoenzyme content of rabbit heart. *Circ Res* 1985;57:406-414.

Lompre AM, Schwartz K, d'Albis, Lacombe G, van Thiem N, Swynghedauw B. Myosin isoenzyme redistribution in chronic heart overload. *Nature* 1979;282:105-107.

Lottspeich F und Zorbas H, Bioanalytik. *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg; Berlin, 1998.

Lowes BD, Minobe W, Abraham W, Rizeq M, Bohlmeier T, Quaife R, Rode R, Dutcher D, Robertson A, Voelkel N, Badesch D, Groves B, Gilbert E, Bristow M. Changes in gene expression in the intact human heart. Downregulation of α -myosin heavy chain in hypertrophied, failing ventricular myocardium. *J Clin Invest* 1997;100:2315-2324.

Lowes BD, Gilbert EM, Abraham WT, Minobe WA. Myocardial gene expression in dilated cardiomyopathy treated with beta-blocking agents. *N Engl J Med* 2002;346:1357-1365.

Luchner A, Muders F, Dietl O, Friedrich E, Blumberg F, Protter AA, Riegger GA, Elsner D. Differential expression of cardiac ANP and BNP in a rabbit model of progressive left ventricular dysfunction *Cardiovasc Res* 2001;51:601-607.

Mahaffey KW, Raya TE, Pennock GD, Morkin E, Goldman S. Left ventricular performance and remodelling in rabbits after myocardial infarction. Effects of a thyroid hormone analogue. *Circulation* 1995;91:794-801.

McNally EM, Kraft R, Bravo-Zehnder M, Taylor DA, Leinwand LA. Full-length rat alpha and beta cardiac myosin heavy chain sequences. *J Mol Biol* 1989;210:665-671.

Mercadier JJ, Lompre A, Wisnewsky C, Samuel J, Bercovici J, Swynghedauw B, Schwartz K. Myosin isoenzymatic changes in several models of rat cardiac hypertrophy. *Circ Res* 1981;49:525-532.

MIAMI Trial Research Group. Metoprolol in acute myocardial infarction (MIAMI): a randomized placebo-controlled international trial. *Eur Heart J* 1985;6:199-226.

Miyata S, Minobe W, Bristow M, Leinwand L. Myosin heavy chain isoform expression in the failing and nonfailing human heart. *Circ Res* 2000;86:386-390.

Moe GW, Grima EA, Seth R, Jeejeebhoy K, Howard RJ, Armstrong PW. Diverse metabolic response of cardiac versus skeletal muscle in experimental heart failure. *Can J Cardiol* 1992;8:104B. Abstract.

Monnet X, Ghaleh B, Colin P, De Curzon O, Giudicelli JF, Berdeaux A. Effects of heart rate reduction with ivabradine on exercise myocardial ischemia and stunning. *J Pharmacol Exp Therap* 2001;299:1133-1139.

Morkin E. Regulation of myosin heavy chain genes in the heart. *Circulation* 1993; 87:1451-1460.

Mulder P, Barbier S, Chagraoui A, Richard V, Henry JP, Lallemand F, Renet S, Lerebours G, Mahlberg-Gaudin F, Thiullez C. Long-term heart rate reduction induced by selective I_f current inhibitor ivabradine improves left ventricular function and intrinsic myocardial structure in congestive heart failure. *Circulation* 2004;109:1674-1679.

Narolska NA, Van Loon RB, Boontje NM, Zaremba R, Penas SE, Russell J, Spiegelberg SR, Huybregts MA, Visser FC, de Jong JW, van der Velden J, Stienen

GJ. Myocardial contraction is 5-fold more economical in ventricular than in atrial human tissue. *Cardiovasc Res* 2005;65:221-229.

Olsen SL, Gilbert EM, Renlund DG, Taylor DO, Yanowitz FD, Bristow MR. Carvedilol improves left ventricular function and symptoms in chronic heart failure: a double-blind randomized study. *J Am Coll Cardiol* 1995;25:1225-1231.

O'Neill L, Holbrook NJ, Fagnoli J, Lakatta EG. Progressive changes from young adult age to senescence in mRNA for rat cardiac myosin heavy chain genes. *Cardio-science* 1991;2:1-5.

Opie LH, Commerford PJ, Gersh BJ, Pfeffer MA. Controversies in ventricular remodeling. *Lancet*. 2006 28;367(9507):356-67.

Pope B, Hoh JFY, Weeds A. The ATPase activities of the rat cardiac myosin isoenzymes. *FBS Letters* 1980;118:205-208.

Quyyumi AA, Panza JA, Diodat JG, Lakatos E, Epstein SE. Circadian variation in ischemic threshold: A mechanism underlying the circadian variation in ischemic events. *Circ* 1993;87:808-814,.

Ragueneau I, Laveille C, Jochemsen R, Resplandy G, Funck-Brentano C, Jaillon P, Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the effects of ivabradine, a direct sinus node inhibitor, on heart rate in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 1998; 64:192-203

Reiser PJ and Kline WO, Electrophoretic separation and quantitation of cardiac myosin heavy chain in eight mammalian species. *Am J Physiol* 1998;274:H1048-H1053,.

Reiser PJ, Portman MA, Ning XH, Moravec CS. Human cardiac myosin heavy chain isoforms in fetal and failing adult atria and ventricles. *Am J Physiol* 2001;280:H1814-H1820.

Rosen MR, Robinson RB. Heart rate: a simple yet complex concept. *Dialogues in cardiovascular medicine* 2001;1:3-16.

Richards, AM, Nicholls MG, Espiner EA, Lainchbury JG, Troughton RW, Elliott J, Frampton C, Turner J, Crozier IG, Yandle TG. B-Type natriuretic peptides and ejection fraction for prognosis after myocardial infarction. *Circulation* 2003;107:2786-2792.

Sabatine MS, Morrow DA, de Lemos JA, Omland T, Desai MY, Tanasijevic M, Hall C, McCabe CH, Braunwald E. Acute changes in circulating natriuretic peptide levels in relation to myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44:1988-1995.

Schipke JD, Buter I, Hohlfeld T, Schmitz-Spanke S, Gams E. Selective I(f) channel inhibition: an alternative for treating coronary artery disease? *Herz*. 2006 Feb;31(1):55-74

Schulz R, Rose J, Skyschally A, Heusch G. Bradicardic agent UL-FS 49 attenuates ischemic regional myocardial dysfunction and reduces infarct size in swine: comparison with the β -Blocker Atenolol. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995;25:216-228.

Schunkert H, Sadoshima JI, Cornelius T, Kagaya Y, Weinberg EO, Izumo S, Riegger G, Lorell BH. Angiotensin II-induced growth response in isolated adult rat hearts. *Circ Res* 1995;76:489-497.

Schwartz K, Lecarpentier Y, Martin JL, Lompre AM, Mercadier JJ, Swynghedauw B. Myosin isoenzymic distribution correlates with speed of myocardial contraction. *J Mol Cell Cardiol* 1981;13:1071-1075.

Shinke T, Takeuchi M, Takaoka H, Yokoyama M. Beneficial effects of heart rate reduction on cardiac mechanics and energetics in patients with left ventricular dysfunction. *Jpn Circ J* 1999;63:957-964.

Simon L, Ghaleh B, Puybasset L, Guidicelli JF, Berdeaux A. Coronary and hemodynamic effects of S16257, a new bradycardic agent, in resting and exercising conscious dogs. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;275:659-666.

Singh BN. Heart rate reduction and morbidity and mortality in cardiovascular disorders. Lippincott, Williams and Wilkins, London 2001.

Singh BN. Morbidity and mortality in cardiovascular disorders: impact of reduced heart rate. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2001;6(4):313-331

Skaravan K. Value of a specific bradycardic agent in cardiac surgery compared to placebo. *Eur Heart J* 1987;8:123-129.

Soeki T, Kishimoto I, Okumura H, Tokudome T, Horio T, Mori K, Kangawa K. C-type natriuretic peptide, a novel antifibrotic and antihypertrophic agent, prevents cardiac remodeling after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:608-616.

Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, et al. A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature*, 1988;332:78-81.

Sutton MG, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Circulation* 2000;101:2981-2988.

Swynghedauw B, Delcayre C, Moalic JM, Lecarpentier Y, Ray A, Mercadier JJ, Lompre AM, Aumont MC, Schwartz K. Isoenzymic changes in myosin and hypertrophy; adaptation during chronic mechanical overload. *Eur Heart J* 1982;Suppl. A:75-82.

Swynghedauw B. Remodelling of the heart in response to chronic mechanical overload. *Eur Heart J* 1989;10:935-943.

The cardiac insufficiency bisoprolol study II (CIBI-II): a randomised trial. *Lancet* 1999; 353:9-13.

Tendera M (2003) If 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, Strassburg*

Thollon C, Cambarrat C, Vian J, Prost JF, Peglion JL, Vilaine JP. Electrophysiological effects of S16257, a novel sino-atrial node modulator, on rabbit and guinea-pig cardiac preparations: comparison with UL-FS 49. *Br J Pharmacol* 1994;112:37-42.

Topol EJ. Neseritide – not verified. *New England Journal of Medicine* 2005; 353:113-16.

Tosaki A, Szekeres L, Hearse DJ. Metoprolol reduces reperfusion-induced fibrillation in the isolated rat heart: protection is secondary to bradycardia. *J Cardiovasc Pharmacol* 1987;10:489-497.

Tsutamoto T, Wada A, Maeda K, et al. Attenuation of compensation of endogenous cardiac natriuretic peptide system in chronic heart failure: prognostic role of plasma

brain natriuretic peptide concentration in patients with chronic symptomatic left ventricular dysfunction. *Circulation* 1997;96:509-516.

Tsutamoto T, Wada A, Maeda K, Hisanga T, Mabuchi N, Hayashi M, et al. Plasma brain natriuretic peptide level as a biochemical marker of morbidity and mortality in patients with asymptomatic or minimally symptomatic left ventricular dysfunction. Comparison with plasma angiotensin II and endothelin-1. *Eur Heart J* 1999;20:1799-807.

Tsutsui H, Spinale FG, Nagatsu M, Schmid PG, Ishihara K, DeFreyte G, Cooper G, Carabello BA. Effects of chronic β -adrenergic blockade on the left ventricular and cardiocyte abnormalities of chronic canine mitral regurgitation. *J Clin Invest* 1994;93:2639-2648.

van der Meer P, Lipsic E, Henning RH, Boddeus K, van der Velden J, Voors AA, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH, Schoemaker RG. Erythropoietin induces neovascularization and improves cardiac function in rats with heart failure after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:125-33.

Vilaine JP, Bidouard JP, Lesage L, Reure H, Peglion JL. Antiischemic effects of ivabradine, a selective heart rate-reducing agent, in exercise-induced myocardial ischemia in pigs. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003;42:688-696.

Waagstein F, Bristow MR, Swedberg K. Beneficial effects of metoprolol in idiopathic dilated cardiomyopathy: Metoprolol in dilated cardiomyopathy (MDC) Trial Study Group. *Lancet* 1993;342:1441-1446.

Wang J, Liu X, Ren B, Rupp H, Takeda N, Dhalla N. Modification of myosin gene expression by Imidapril in failing heart due to myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 2002;34:847-857.

Wang J, Guo X, Dhallas NS. Modification of myosin protein and gene expression in failing hearts due to myocardial infarction by enalapril or losartan. *Biochem Biophys Acta* 2004;1690:177-184.

Waspe LE, Ordahl CP, Simpson PC. The cardiac β -myosin heavy chain gene is selectively induced in α_1 -adrenergic receptor-stimulated hypertrophy of cultured rat heart myocytes. *J Clin Invest* 1990;85:1206-1214.

Weber KT. Extracellular matrix remodeling in heart failure: a role for de novo angiotensin II generation. *Circulation* 1997;96:4065-4082.

Westermeier R, Electrophoresis in Practice. VCH, 1993.

Yamamoto K, Burnett JC, Jougasaki M. Superiority of brain natriuretic peptides as a hormonal marker of ventricular systolic and diastolic dysfunction and ventricular hypertrophy. *Hypertension* 1996;28:988-994.

Yasumura Y, Takemura K, Sakamoto A, Kitakaze M, Miyatake K. Changes in myocardial gene expression associated with betablocker therapy in patients with chronic heart failure. *J Card Fail* 2003 Dec;9(6):469-74.

Yokota N, Bruneau B, Fernandez B, Kuroski de Bold M, Piazza L, Eid H, de Bold A. Dissociation of cardiac hypertrophy, myosin heavy chain isoform expression, and natriuretic peptide production in DOCA-salt rats. *Am J Hypertens* 1995;8:301-310.

Yusuf S, Peto R, Lewis J, Collins R, Sleight P. Beta blockade during and after myocardial infarction: an overview of the randomized trials. *Prog Cardiovasc Dis* 1985 March; 27(5): 335-371.

Zhang ML, Elkassen S, Davidoff AW, Saito K, ter Keurs HE. Losartan inhibits myosin isoform shift after myocardial infarction in rats. *Mol Cell Biochem* 2003;251:111-117.

8 Abbildungsverzeichnis

Abb.1: Schematische Darstellung des I_f -Kanals	6
Abb. 2: Querschnitt durch das dünne Aktin-Filament.....	9
Abb. 3: Aktin- und Myosin-Filamente im Längsschnitt und im Querschnitt.	9
Abb. 4: Myosinketten	12
Abb. 5: Schematische Darstellung von proBNP und dessen enzymatische Umwandlung	14
Abb. 6: Strukturformel Metoprolol	17
Abb. 7: Strukturformel Ivabradin	18
Abb. 8: Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls	20
Abb. 9: Elektrophorese: Wanderung von geladenen Teilchen in einem elektrischen Feld	24
Abb. 10: Elektrophorese-Trennkammer mit Kühlung sowie Gel-Guss-Zubehör	25
Abb. 11: Acrylamidgel nach 20 h/120 V Elektrophorese	27
Abb. 12: Acrylamidgel: Gewebespektrum	27
Abb. 13: Auswertung der MHC Isoenzyme mit TINA Software	28
Abb. 14: Herzfrequenz [HF]	32
Abb. 15: Aortenfluss [AoF]	32
Abb.16: Maximaler linksventrikulärer Spitzendruck [LVP_{max}]	33
Abb. 17: Maximale Druckänderungsgeschwindigkeit [dP/dt_{max}]	34
Abb.18: Maximale Relaxationsgeschwindigkeit [dP/dt_{min}]	34
Abb. 19: Minimaler enddiastolischer linksventrikulärer Druck [LVP_{ed}]	35
Abb. 20: Acrylamidgel mit Proben der verschiedenen Gruppen	37
Abb. 21: Verteilung der Isoenzyme im linken Ventrikel	37
Abb. 22: Verteilung der Isoenzyme im rechten Ventrikel.	38
Abb. 23: Verteilung der Isoenzyme im Septum	38

Abb. 24: Isoenzym-Verteilung bei der Sham-Gruppe	39
Abb. 25: Isoenzym-Verteilung bei der Placebo-Gruppe	40
Abb. 26: Isoenzym-Verteilung bei der Metoprolol-Gruppe	40
Abb. 27: Isoenzym-Verteilung bei der Ivabradin-Gruppe	41
Abb. 28: BNP-Gehalt im Kaninchenblut zu verschiedenen Zeitpunkten	42
Abb. 29: Infarktgrösse	42
Abb. 30: Mortalität nach Ligatur und Medikamentengabe	43

9 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht über die Anzahl der Versuchstiere	17
Tab. 2: Auswertung mit TINA-Software.....	29
Tab. 3: HF-Reduktion bei unterschiedlicher Dosierung und Spezies.	51

10 Danksagung

Ich danke, Herrn Professor Jochen D. Schipke, der mir mit Rat und Tat, Lob und Kritik, und natürlich seinem umfangreichen Wissen immer helfend zur Seite stand, so wie für das interessante Thema und die Möglichkeit zur Durchführung der Arbeit;

Herrn Prof. Dr. A. Gödecke, der so freundlich war, das Korreferat zu übernehmen;

Frau Dr. Simone Schmitz-Spanke für die intensive Betreuung und die zahlreichen Hilfestellungen bei der Durchführung der Versuche;

Frau Dr. Solange Pomblum, die mir ihr großes Wissen über die Myosin-Isoenzyme wiederholt und geduldig zur Verfügung gestellt hat;

Allen Mitarbeitern der Experimentellen Chirurgie, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen;

Meiner Mutter und Schwester für die stetige Unterstützung und den Glauben an mich;

Tobias Sobottka, der nicht nur mein private EDV-Abteilung war, sondern mich stets motivierte und unterstützte;

Allen meinen Freunden für die Unterstützung

11 Lebenslauf

Name	Monika Agnes Schepan
Geburtsdatum	28. Januar 1979 in Königshütte
Schule	1985-1989 Grundschule Königshöherweg in Wuppertal 1989-1998 Gymnasium St-Anna-Schule in Wuppertal
Studium	04/99 Beginn des Medizinstudiums an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf 03/01 Physikum 03/02 Erstes Staatsexamen 08/04 Zweites Staatsexamen 10/04 – 11/05 Praktisches Jahr im Bethesda Krankenhaus in Wuppertal (Lehrkrankenhaus der Universität Bochum) 11/05 Drittes Staatsexamen
seit 01/06	Assistenzärztin in der Anästhesiologie in den Berufgenossenschaftlichen Kliniken Bergmannsheil in Bochum

Myosin-Isoenzyme in postischmämischen Herzen

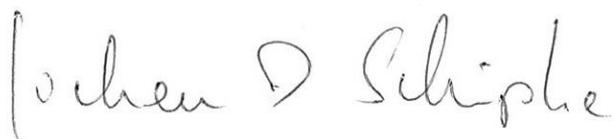
Doktorandin: Agnes Monika Schepan

In der hier verwendeten Dosierung von 0,25 mg/kg führte der β -Blocker Metoprolol zu keiner signifikanten Herzfrequenzsenkung oder zu anderen hämodynamischen Auswirkungen. Ivabradin hingegen senkte während der Operation die HF um 16 %. Nach vierwöchiger Behandlung konnte für beide Substanzen keine HF-Reduktion oder Veränderung der anderen hämodynamischen Parameter beobachtet werden. Beide Medikamente konnten die Infarktgröße und die Mortalität senken.

Bei den Myosin-Isoformen zeigte sich, dass die Behandlung mit Metoprolol und Ivabradin den Trend zeigte, den Myosinshift zu limitieren. Da keine mechanischen Veränderungen zu beobachten waren, müssen andere Faktoren den Myosinshift gehemmt haben. Der Norepinephringehalt, die Infarktgröße, direkte Wirkungen auf Myozyten oder eine Neovaskularisation durch Ivabradin bieten mögliche Erklärungen für unsere Beobachtungen. Die veränderte Myosinexpression korrelierte mit der BNP-Konzentration. Daraus schließen wir, dass die Expression der Myosin-Isoenzyme multifaktoriell geregelt ist. Neben mechanischen Faktoren spielen endogene Prozesse eine Rolle. Im direkten Vergleich der beiden Substanzen zeigten sich keine Vorteile von Ivabradin gegenüber Metoprolol. Beide Substanzen zeigten keine Besserung der kardialen Funktion aber führten zu einer Limitierung des Myosinshifts. Ivabradin und Metoprolol scheinen den Prozess des Remodellings auf dem Niveau der Myosin-Isoenzyme zu hemmen.

Düsseldorf, den 18. September 2006

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



Forschungsgruppe Exp. Chirurgie

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf