

Aus dem Institut für Pharmakologie der Heinrich–Heine–Universität Düsseldorf

Institutsleitung: Univ. Prof. Dr. Jens W. Fischer

Analyse der mechanischen Funktion isolierter Papillarmuskelpräparate nach akutem Myokardinfarkt

Dissertation

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

vorgelegt von

Carina Irmgard Annika Dreblow

Düsseldorf, August 2024

Druckgenehmigung

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

Gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. N. Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. J. Schmitt

Zweitgutachterin: Prof. Dr. rer. nat. M. Krüger

Widmung

Meinem Mann, meinen Kindern und engsten Freunden

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung – deutsch	V
Summary – english.....	VI
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis	X
1. Einleitung	1
1.1. Der akute Myokardinfarkt	1
1.2. Herzanatomie	1
1.2.1. Herzanatomie des Menschen	2
1.2.2. Herzanatomie der Maus	2
1.3. Koronaranatomie.....	3
1.3.1. Koronaranatomie des Menschen	3
1.3.2. Koronaranatomie der Maus.....	4
1.3.3. Vergleich der Koronaranatomien	6
1.3.4. Papillarmuskeln.....	7
1.4. Der akute Myokardinfarkt	7
1.4.1. Symptomatik des Myokardinfarkts.....	8
1.4.2. Phasen und Zonen nach Myokardischämie	8
1.4.2.1. Die Ischämiezone	9
1.4.2.2. Die Randzone / Borderzone.....	11
1.4.2.3. Die nicht ischämische Zone (<i>remote</i> Myokard).....	12
1.4.2.4. Das ventrikuläre Remodeling.....	13
1.5. Das Myokard und die Herzmuskelzelle.....	14
1.5.1. Die Sarkomere.....	15
1.5.2. Der Querbrückenzyklus.....	19
1.5.3. Kraft – Längen – Relation der Muskelmechanik.....	21
1.6. Die Regulation der Herzfunktion	22
1.6.1. Der Frank–Starling–Mechanismus.....	23
1.6.2. Der Sympathikus am Herzen.....	27
1.6.2.1. Positive Inotropie.....	27
1.6.2.2. Lusitropie	27

1.6.2.3.	Chronotropie.....	27
1.6.3.	Die Schrittmacherzelle.....	28
1.6.4.	Das Schrittmacher-Aktionspotential.....	29
1.6.5.	Das Herzmuskelzellen-Aktionspotential.....	31
1.6.6.	Adrenorezeptoren und Calcium-Cycling.....	32
1.7.	Induktion der Myokardischämie am Mausmodell.....	34
1.7.1.	Experimentelle Induktionsmechanismen.....	34
1.7.1.1.	Permanente Ligatur.....	35
1.7.1.2.	Ischämie – Reperfusion.....	35
1.7.1.3.	Geschlossener versus offener Thorax.....	36
1.7.2.	Organbad.....	37
1.8.	Fragestellung.....	39
2.	Material und Methoden.....	40
2.1.	Tierversuche.....	40
2.1.1.	Verwendete Tiere.....	40
2.1.2.	Induktion des Myokardinfarkts.....	40
2.1.2.1.	Voroperation der Ischämie-Gruppe.....	41
2.1.2.2.	Induktion der Ischämie bei geschlossenem Thorax.....	42
2.1.3.	Verwendetes Areal.....	43
2.1.4.	Tyrode-Lösung.....	43
2.1.5.	Organbad und Messinstrumente.....	46
2.1.6.	Probenentnahme und Präparation.....	46
2.2.	Analyse des <i>remote</i> Myokards.....	51
2.2.1.	Frequenzanalyse.....	51
2.2.2.	Kraftanalyse mittels Isoproterenol.....	52
2.2.3.	Kraftanalyse mittels Vorspannung der Papillarmuskeln.....	53
2.2.4.	Abbruchkriterien.....	54
2.2.5.	Normierung.....	55
2.2.5.1.	Papillarmuskel – Gewichte.....	55
2.2.5.2.	Querdurchmesser der Papillarmuskeln.....	55
2.2.6.	Datenanalyse-Software Labchart©.....	55
2.2.7.	Standardbedingungen.....	57
2.2.8.	Statistik.....	57

3. Ergebnisse	58
3.1. Stimulation und physikalische Größen	58
3.2. Amplituden	59
3.2.1. Amplituden nach elektrischer Stimulation	59
3.2.2. Amplituden unter beta-adrenerger-Stimulation	61
3.2.3. Amplituden unter Vorspannung	64
3.3. Geschwindigkeit des Kraftanstiegs	66
3.3.1. Geschwindigkeit des Kraftanstiegs unter elektrischer Stimulation.....	67
3.3.2. Geschwindigkeit des Kraftanstiegs unter beta-adrenerger Stimulation	68
3.3.3. Geschwindigkeit des Kraftanstiegs unter Vorspannung.....	70
3.4. Geschwindigkeiten des Kraftabfalls.....	71
3.4.1. Geschwindigkeit des Kraftabfalls nach elektrischer Stimulation	72
3.4.2. Geschwindigkeit des Kraftabfalls unter beta-adrenerger Stimulation...	73
3.4.3. Geschwindigkeit des Kraftabfalls unter Vorspannung	75
3.5. Vergleiche der Ausgangswerte	77
3.5.1. Amplituden	77
3.5.2. Geschwindigkeiten des Kraftanstiegs und –abfalls	79
4. Diskussion	81
4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse	81
4.2. Stimulation mit Frequenzmodulation.....	81
4.2.1. Amplituden unter Frequenzmodulation.....	81
4.2.2. Geschwindigkeit des Kraftanstiegs unter Frequenzmodulation	83
4.2.3. Geschwindigkeit des Kraftabfalls unter Frequenzmodulation	84
4.2.4. Zusammenfassung zur Frequenzmodulation	84
4.3. Stimulation mit Isoproterenol	85
4.3.1. Amplituden unter beta-adrenerger Stimulation	85
4.3.2. Geschwindigkeit des Kraftanstiegs unter beta-adrenerger Stimulation	87
4.3.3. Geschwindigkeit des Kraftabfalls unter beta-adrenerger Stimulation...	89
4.4. Stimulation unter Vorspannung	89
4.4.1. Amplituden unter variabler Vorspannung.....	90
4.4.2. Geschwindigkeit des Kraftanstiegs unter variabler Vorspannung	91
4.4.3. Geschwindigkeit des Kraftabfalls unter variabler Vorspannung	92
5. Schlussfolgerung	93

Literaturverzeichnis	95
Danksagung.....	106

Zusammenfassung – deutsch

Ein Myokardinfarkt führt durch den Verschluss einer Herzkranzarterie und der daraus resultierenden Ischämie zu einem myokardialen Funktionsverlust, auch im nicht-ischämischen Bereich (*remote* Myokard). Diese Dissertation befasst sich mit der Fragestellung, ob die aktive Kraftentwicklung auch im *remote* Myokard eingeschränkt ist und dadurch zu der Entstehung von akuter Herzinsuffizienz nach Infarkt beitragen könnte. Die Versuche erfolgten am Maus-Modell nach einstündiger Okklusion der linken vorderen Koronararterie. Als Referenz des *remote* Myokards diente der posteriore Papillarmuskel, der aus dem linken Ventrikel isoliert und im Organbad elektrisch stimuliert wurde. Unter der Variation der Stimulationsfrequenzen, der Konzentration des β -Sympathomimetikums Isoproterenol und der Vorspannung, wurden die Kraftamplitude sowie die Geschwindigkeiten der Kraftzu- und abnahme gemessen. 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion zeigte das *remote* Myokard im Vergleich zu nicht-infarzierten Herzen eine Tendenz zu einer geringeren Kraftentwicklung mit fallender Kraftamplitude und reduzierter Geschwindigkeit der Kraftzu- und Kraftabnahme unter Steigerung der Stimulationsfrequenzen und erhöhten Vorspannungen. Unter einer Vorspannung von 5 mN war die Kraftamplitude des *remote* Myokards signifikant niedriger. Unter dem Einfluss steigender Isoproterenol-Konzentrationen ist das infarzierte Myokard befähigt, höhere Kraftamplituden, Kraftanstiegs- und Kraftabfallgeschwindigkeiten zu entwickeln.

Zusammenfassend ist zu konstatieren, dass anhand von isolierten Papillarmuskel-Präparationen eine Tendenz zur Funktionseinschränkung des *remote* Myokards in Bezug auf die aktive Kraftentwicklung festgestellt wurde, jedoch ohne signifikante Unterschiede verzeichnen zu können. Lediglich unter steigenden Vorspannungen zeigte sich ein signifikanter Unterschied zu nicht-infarzierten Herzen. Durch beta-adrenerge Stimulation können nicht signifikante Steigerungen in der Kraftentwicklung erreicht werden. Ein relevanter Beitrag des *remote* Myokards zur Einschränkung der ventrikulären Pumpleistung nach Ischämie/Reperfusion ist zu vermuten, bedarf aber weiterer Forschung.

Summary – english

hat formatiert: Englisch (Vereinigte Staaten)

Formatiert: Block

Myocardial infarction is caused by coronary artery occlusion. Subsequent myocardial ischemia leads to functional loss of the ischemic myocardium, but also of the non-ischemic remote myocardium. The following work addressed the question whether active force production is also impaired in the remote myocardium, thereby contributing to the development of acute heart failure. Using a mouse model of transient surgical occlusion of the left anterior descending coronary artery, posterior papillary muscles representing the remote myocardium, were electrically paced ex vivo in an organ bath apparatus. The amplitude of generated force as well as the speed of force increase and decrease were investigated while increasing the pacing frequencies, the sympathomimetic isoproterenol and the muscle pretension. 24 hours after ischemia/reperfusion, tendencies towards reduced force amplitudes and decreased velocities of force increase and decrease at higher pacing rates and higher muscle pretension were observed compared to non-infarcted hearts. At a pretension of 5 mN the amplitude of myocardial force in the remote myocardium was significantly lower. At increasing molar concentrations of isoproterenol, papillary muscles from infarcted hearts demonstrated a trend for increased force amplitudes and velocities of force decrease and increase in remote myocardium compared to controls.

In sum, isolated mouse papillary muscle preparation demonstrated a tendency towards reduced active force generation in remote myocardium. A significant reduction of force production was observed. In contrast to these results β -adrenergic stimulus leads to an increase of force. Only under high muscle pretension a relevant contribution of the remote myocardium to the loss of ventricular function following ischemia/reperfusion injury appears likely, but requires further research.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Anatomie des humanen Koronargefäßsystems	4
Abb. 2: Ursprung und Verlauf der linken Koronararterie der swiss albino Maus	5
Abb. 3: Ursprung und Verlauf der rechten Koronararterie der swiss albino Maus.....	6
Abb. 4: Schematische Einteilung der Zonen und Gebiete nach Okklusion der LAD am Mäuseherz	9
Abb. 5: Schematische Darstellung der Phasen und Mechanismen nach der Ischämie.....	11
Abb. 6: Zelluläre Mechanismen des Remodeling	14
Abb. 7: Schematische Darstellung des Sarkomers.....	16
Abb. 8: Schematische Darstellung der Sarkomere auf filamentärer Ebene	17
Abb. 9: Schematische Darstellung des Aktinfilamentes mit dem Troponinkomplex ...	18
Abb. 10: Schematische Darstellung des Myosinmoleküls	19
Abb. 11: Schematische Darstellung des Querbrückenzyklus.....	21
Abb. 12: Arbeitsdiagramm des Skelettmuskels	22
Abb. 13: Inotropie-Mechanismen von Papillarmuskeln unter Vorspannung.....	25
Abb. 14: Inotropie-Mechanismen von Papillarmuskeln des Menschen unter Zugabe von Noradrenalin	26
Abb. 15: Schematische Darstellung der Schrittmachertelle des Sinusknotens	28
Abb. 16: Das Schrittmacher-Aktionspotential und die damit assoziierten Ionenströme	30
Abb. 17: Schematische Darstellung der über beta-Rezeptoren vermittelten Signalkaskaden und der myozytäre Calciumkreislauf	33
Abb. 18: Schematische Darstellung des verwendeten Organbades	38
Abb. 19: Fadenschlingen in einer Petrischale mit Silikonboden	47
Abb. 20: Mäuseherz mit sichtbarer hämorrhagischer Ischämiezone an der Herzbasis.	48
Abb. 21: Präparierter Papillarmuskel.....	49
Abb. 22: Teilpräparierter Papillarmuskel mit Ischämie an der Basis.....	50
Abb. 23: Exemplarische Aufzeichnung mittels LabChart©	57
Abb. 24: Graphische Darstellung der Veränderungen der Kraftamplitude unter steigenden Stimulationsfrequenzen normiert auf die Muskelmasse	60
Abb. 25: Graphische Darstellung der Veränderung der Kraftamplitude unter steigenden Isoproterenol-Konzentrationen normiert auf die Muskelmasse	62
Abb. 26: Graphische Darstellung von Mittelwerten der Differenzwerte zum Ausgangswert der Kraftamplituden unter steigenden Isoproterenol- Konzentrationen normiert auf die Muskelmasse.....	63
Abb. 27: Graphische Darstellung der Mittelwerte der Kraftamplitude bei einer Isoproterenol-Konzentration von 300 nM	64
Abb. 28: Graphische Darstellung der Veränderung der Kraftamplitude unter steigender Vorspannung normiert auf die Muskelmasse	65
Abb. 29: Graphische Darstellung der Mittelwerte der Kraftamplitude bei einer Vorspannung von 5 mN	66

Abb. 30: Graphische Darstellung der Veränderungen der Kraftanstiegsgeschwindigkeiten unter steigenden Stimulationsfrequenzen normiert auf die Muskelmasse	67
Abb. 31: Graphische Darstellung von Veränderungen der Geschwindigkeiten des Kraftanstieges unter steigenden Isoproterenol-Konzentrationen normiert auf die Muskelmasse	69
Abb. 32: Graphische Darstellung der Mittelwerte der Kraftanstiegsgeschwindigkeit bei einer Isoproterenol-Konzentration von 3 nM	70
Abb. 33: Graphische Darstellung von Veränderungen der Kraftanstiegsgeschwindigkeiten unter steigender Vorspannung normiert auf die Muskelmasse	71
Abb. 34: Graphische Darstellung der Veränderungen der Kraftabfallgeschwindigkeiten unter steigenden Stimulationsfrequenzen normiert auf die Muskelmasse	72
Abb. 35: Graphische Darstellung der Mittelwerte der Kraftabfallgeschwindigkeit bei einer Stimulationsfrequenz von 2 Hz	73
Abb. 36: Graphische Darstellung von Veränderungen der Kraftabfallgeschwindigkeit unter steigenden Isoproterenol-Konzentrationen normiert auf die Muskelmasse	74
Abb. 37: Graphische Darstellung der Mittelwerte der Kraftabfallgeschwindigkeiten bei einer Isoproterenol-Konzentration von 30 nM	75
Abb. 38: Graphische Darstellung von Veränderungen der Kraftabfallgeschwindigkeit unter steigender Vorspannung normiert auf die Muskelmasse	76
Abb. 39: Graphische Darstellung der Mittelwerte der Kraftabfallgeschwindigkeit bei einer Vorspannung von 5 mN.....	77
Abb. 40: Graphische Darstellung der Kraftamplituden vor Versuch 2 (beta-adrenerge Stimulation) und Versuch 3 (Vorspannung) im Vergleich	78
Abb. 41: Graphische Darstellung der Kraftanstiegs- und Kraftabfallgeschwindigkeiten vor Versuch 2 (beta-adrenerge Stimulation) und Versuch 3 (Vorspannung) im Vergleich	79
Abb. 42: Beziehungsdiagramm der Mechanismen zur Beeinflussung der Kontraktionskraft.....	82
Abb. 43: Schematisches Kraft-Zeit-Diagramm mit Darstellung der Kraftanstiegsgeschwindigkeit.....	88

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der Tyrode-Lösung (Pharmakologie der Universität Würzburg).....	44
Tabelle 2: Zusammensetzung des aus der Tyrode-Lösung (Tabelle 1) hergestellten Stock I	44
Tabelle 3: Zusammensetzung des aus der Tyrode-Lösung (Tabelle 1) hergestellten Stock II	44
Tabelle 4: Zusammensetzung des aus Tyrode-Lösung (Tabelle 1) hergestellten Stock III	45
Tabelle 5: Zusammensetzung der Tyrode-Lösung aus dem Forschungslabor der klinischen Kardiologie der HHU Düsseldorf	45
Tabelle 6: Anzahl der Versuchstiere für jede Vorspannung	92

Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylatcyclase
ADP	Adenosindiphosphat
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
ATP	Adenosinriphosphat
Ca ²⁺	Calium-Ion
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
Gs	Stimulatorisches G-Protein
HF	<i>Heart failure</i> (Herzinsuffizienz)
HZV	Herz-Zeit-Volumen
I/R	Ischämie/Reperfusion
LAD	<i>left anterior descending</i> (äquivalent zu RIVA)
LCA	<i>left coronary artery</i> (linke Herzkranzarterie)
RIVA	Ramus interventricularis anterior
RyR	Ryanodin-Rezeptor
SEM	<i>Standard error of the mean</i> (Standardfehler)
SERCA2a	<i>Sarco/endoplasmatic reticulum calcium ATPase 2a</i>
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum

hat formatiert: Englisch (Vereinigte Staaten)

1. Einleitung

1.1. Der akute Myokardinfarkt

Der akute Myokardinfarkt ist, basierend auf den Daten des Statistischen Bundesamtes (Destatis), weiterhin die zweithäufigste Todesursache in Deutschland [1]. Viele Mechanismen, insbesondere die des myokardialen Umbaus und der aktiven Kraftentwicklung nach dem Infarkt, sind bislang unzureichend untersucht und daher Gegenstand dieser Dissertation am Maus-Modell.

Die Zahl kardiovaskulärer Erkrankungen und Ereignisse steigt und führt die Mortalitätsstatistik in Deutschland mit insgesamt 340.619 von 1.023.687 Todesfällen (33,27 %) im Jahr 2021 an [1]. Folgerichtig stirbt jeder dritte Mensch in diesem Land an einem kardiovaskulären Ereignis. Insgesamt sind die Zahlen aktuell wieder leicht steigend [2]. In rund 80 % der Fälle kommt es zum Teil bereits präklinisch zum kardiogenen Schock im Rahmen eines Linksherzversagens, insbesondere bei größeren Vorderwandinfarkten, weshalb sich auch in dieser Arbeit das Infarktareal im Versorgungsgebiet der linken Koronararterie (LAD/RIVA) befindet. Die Mortalität ist 30 Tage nach dem Akutereignis am höchsten [3], aber auch das 5-Jahres-Outcome zeigt eine Mortalität von rund 20 % [4,5].

1.2. Herzanatomie

Folgend eine kurze Darstellung der Herzanatomie des Menschen und der Maus, insbesondere zur Lage der Papillarmuskeln, die im experimentellen Teil Verwendung finden.

1.2.1. Herzanatomie des Menschen

Das Herz des Menschen ist ein etwa faustgroßes konisches Hohlorgan mit einem Gewicht von 250-300 Gramm bei Frauen und 300-350 Gramm bei Männern. Größe und Gewicht variieren bei Sportlern oder angeborenen bzw. erworbenen Herzinsuffizienzen (HF). Die Herzfrequenz beträgt zwischen 60 und 100 Schlägen pro Minute. Makroanatomisch gliedert sich das Herz in eine linke und rechte Hälfte mit Trennung durch die Herzscheidewand, folgend auch Septum genannt. Beide Hälften enthalten wiederum zwei Bereiche, je einen Vorhof (Atrium) und eine Kammer (Ventrikel). Über die obere Hohlvene (Vena cava superior) gelangt sauerstoffarmes Blut in den rechten Vorhof. Der rechte Vorhof ist mit der rechten Kammer durch die Trikuspidalklappe, eine Segelklappe, getrennt. Am Boden des rechten Ventrikels ermöglichen drei Papillarmuskeln mit ihren Sehnenfäden durch Kontraktion die Öffnung der Trikuspidalklappe. Den rechten Ventrikel verlässt das Blut über die Pulmonalklappe, eine Taschenklappe, in die Lunge zur Oxygenierung. Über die Pulmonalarterien gelangt das Blut in den linken Vorhof. Dieser ist durch die Mitralklappe, ebenfalls eine Segelklappe, getrennt vom linken Ventrikel. Am Boden des linken Ventrikels befinden sich zwei Papillarmuskeln, die über Sehnenfäden für die Öffnung der Mitralklappe sorgen. Der linke Ventrikel pumpt etwa 4,5 – 6 Liter Blutvolumen pro Minute über die Aortenklappe, eine Taschenklappe, in die Peripherie zur Organversorgung. Ebenso erreicht sauerstoffreiches Blut, im Sinus aortae, die epikardial gelegenen Koronargefäße zur Eigenversorgung des Herzens [6–8].

1.2.2. Herzanatomie der Maus

Das Herz der Maus ist ein ovales Hohlorgan mit einem Gewicht von 0,12 – 0,15 Gramm. Die Herzfrequenz liegt bei 350 – 700 Schlägen pro Minute, mit einem Herzzeitvolumen von 11 bis 16 ml pro Minute. Es findet sich ebenfalls eine rechte und linke Herzhälfte, getrennt durch ein Septum, mit je einem Vorhof und einem Ventrikel. Die Anordnung und Funktion der Segel- und Taschenklappen sind ebenfalls identisch mit denen des Menschen. Sauerstoffarmes Blut gelangt bei der Maus jedoch über zwei separate obere

Hohlvenen in das Herz. Durch die ovale statt konische Form ergeben sich leichte Lagedifferenzen. Die Anzahl und Lage der Papillarmuskeln sind vergleichbar. Ein Papillarmuskel des linken Ventrikels liegt septumnah, der andere unmittelbar zur lateralen Wand des linken Ventrikels. Der Abgang der Koronargefäße liegt im Vergleich zum Menschen nicht im Sinus aortae, sondern oberhalb dessen. Die intramyokardiale statt epikardiale Lage der Koronarien ist ebenfalls different [7].

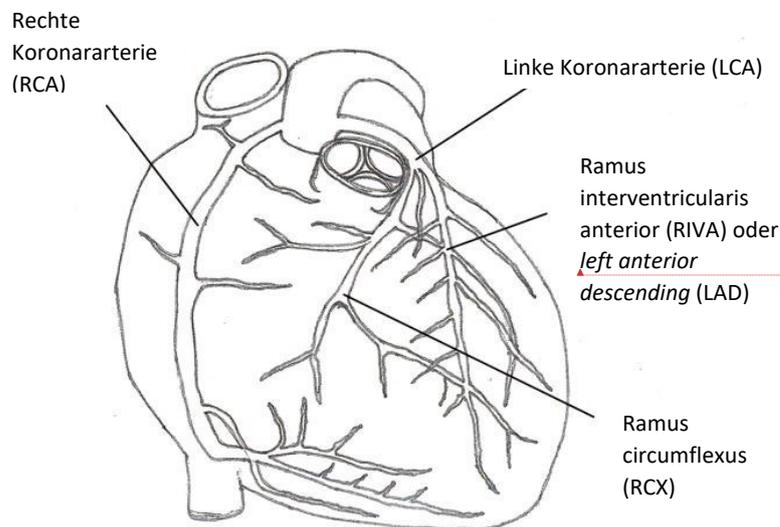
1.3. Koronaranatomie

Als Grundlage zum Verständnis des im experimentellen Teil verwendeten *remote* Myokards der Maus, sind die Grundlagen der koronaren Anatomie, auch im Vergleich von Maus und Mensch, essenziell und werden daher näher beleuchtet.

Formatiert: Block

1.3.1. Koronaranatomie des Menschen

Der Aorta ascendens im Sinus aortae entspringen, kurz hinter der Aortenklappe, die Hauptstämme der linken und rechten Herzkranzarterie. Bei der im Folgenden benannten Versorgung wird nur der Normaltyp betrachtet. Die Arteria coronaria sinistra (LCA) gibt den Ramus circumflexus (RCX) mit Nebenästen ab, zur Versorgung des linken Vorhofes sowie der Seitenwand und Teilen der Hinterwand des linken Ventrikels. Weiterhin zweigt sich aus der LCA der Ramus interventricularis anterior (RIVA) / *left anterior descending* (LAD) mit Nebenästen ab. Diese dienen der Versorgung der Vorderwand des linken Ventrikels, Teilen der Vorderwand des rechten Ventrikels sowie den vorderen zwei Dritteln des Ventrikelseptums. In diesem Versorgungsgebiet finden sich auch beide Papillarmuskeln (Musculus papillaris anterior und posterior) des linken Ventrikels sowie der Musculus papillaris septalis des rechten Ventrikels.



hat formatiert: Englisch (Vereinigte Staaten)

Abb. 1: Anatomie des humanen Koronargefäßsystems

(eigene Darstellung modifiziert nach Erdmann [9])

Die Arteria coronaria dextra (RCA) verzweigt sich folgend ebenfalls in Nebenäste und versorgt Sinus- und AV-Knoten, das rechte Atrium, den korrespondierenden Teil der Hinterwand des linken Ventrikels, den rechten Ventrikel mit Musculus papillaris anterior und posterior sowie das posteriore Drittel des Ventrikelseptums, einschließlich des HIS-Bündels [10].

1.3.2. Koronaranatomie der Maus

Die Position des Herzens im Thorax der Maus ist vergleichbar mit der des Menschen. Das Herz hat jedoch eine ovale statt konische Form und liegt dem Zwerchfell nicht an.

Die Koronaranatomie der Maus ist ebenfalls im Wesentlichen vergleichbar mit der des Menschen, wobei die makroskopische Darstellung bei der Maus, aufgrund der intramyokardialen Lage, nur partiell gelingt [7]. Zwei Publikationen stellen die Koronaranatomie der Maus gut dar. Die Koronaranatomie der Maus vom Typ C57BL/6 untersuchte *Fernández et al.* [11]. Der Verlauf der Koronararterien der swiss albino Maus wurde von *Yoldas et al.* [12] erforscht.

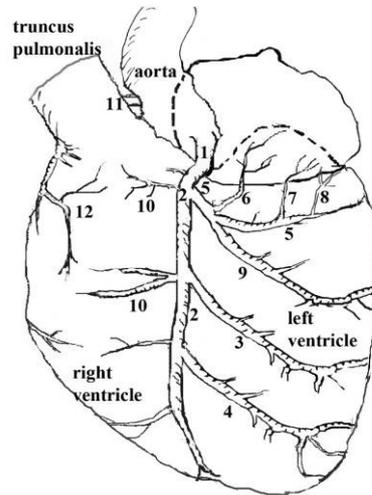
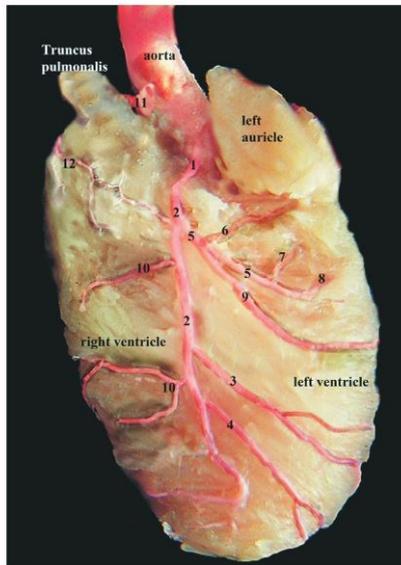


Fig. 1: A, Origin and course of the left coronary artery (auricular surface); B, diagram of the origin and course of the left coronary artery (auricular surface). 1 = arteria coronaria sinistra, 2 = ramus interventricularis paraconalis, 3 = ramus collateralis sinister proximalis, 4 = ramus collateralis sinister distalis, 5 = ramus circumflexus sinister, 6 = ramus proximalis atrii sinistri, 7 = ramus intermedius atrii sinistri, 8 = ramus distalis atrii sinistri, 9 = ramus proximalis ventriculi sinistri, 10 = rami ventriculares, 11 = arteria coronaria dextra, 12 = ramus conii arteriosi.

Abb. 2: Ursprung und Verlauf der linken Koronararterie der swiss albino Maus

(Yoldas et al., mit freundlicher Genehmigung des Autors [12])

Die linke Herzkranzarterie entspringt im Sinus aortae und verläuft folgend in den Ramus interventricularis paraconalis. Dieser wiederum gibt den Ramus circumflexus sinister ab, dem ein weiterer Ast der Ramus proximalis ventriculi sinistri entspringt. Seine terminalen Äste dienen der Versorgung der Musculi papillares des linken Ventrikels. Diese werden ebenfalls über einen Ramus septalis als Marginalast aus der linken Koronararterie perfundiert.

Die Koronar Anatomie der rechten Herzkranzarterie wird hier nur kurz dargestellt, weil Rami perforantes aus beiden Herzkranzarterien zur Versorgung des distalen Septumdrittels dienen. Eine Mitversorgung der Papillarmuskeln durch Rami perforantes ist daher nicht auszuschließen.

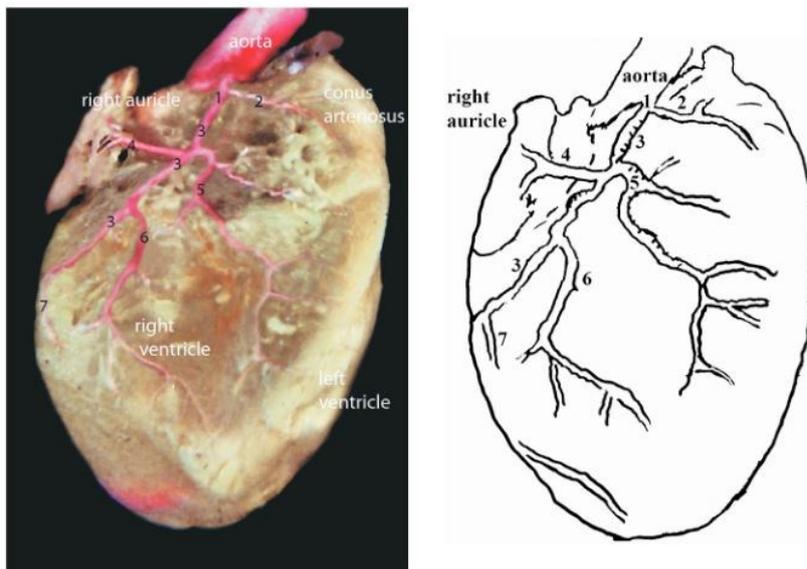


Fig. 2: A, Origin and course of the right coronary artery (atrial surface); B, diagram of the origin and course of the right coronary artery (atrial surface). 1 = arteria coronaria dextra, 2 = ramus conii arteriosus, 3 = ramus circumflexus dexter, 4 = ramus proximalis atrii dextri, 5 = ramus proximalis ventriculi dextri, 6 = ramus marginis ventriculi dextri, 7 = ramus distalis ventriculi dextri.

Abb. 3: Ursprung und Verlauf der rechten Koronararterie der swiss albino Maus

(Yoldas *et al.*, mit freundlicher Genehmigung des Autors [12])

1.3.3. Vergleich der Koronar anatomien

Im Vergleich zwischen Mensch und Maus lassen sich viele Gemeinsamkeiten, aber auch Differenzen eruieren. Zwei Haupt-Koronararterien sind in beiden Spezies vorhanden. Der Ursprung jedoch findet sich bei der Maus oberhalb des Sinus aortae, beim Menschen im Sinus aortae. Die Lage variiert ebenfalls von einem intramyokardialen Verlauf bei der Maus zu einer epikardialen Position beim Mensch [7]. Dies ist unter anderem der Grund dafür, weshalb die Darstellung bei der Maus lange Zeit nur erschwert und erst vor einigen Jahren in diversen Veröffentlichungen gelang. Beschrieben sind diverse Variabilitäten der LCA analog im Verlauf und der Länge des Hauptstammes sowie der Lokalisation der abgehenden Äste mittels Fluoreszenzdarstellung durch *Chen et al.* analog zum Menschen [13]. Mittels Nachweisverfahren mit India Ink, microfil injection und Micro-CT sowie Fluoreszenz

gelang auch *Kolesová et al.* eine genauere Darstellung der Koronararterien der Maus [14].

Es existiert leider bislang, auch in Rücksprache mit den Autoren der zuvor zitierten Publikationen, keine Arbeit mit einer Darstellung der Topografie der koronaren Versorgungsgebiete bei der Maus.

1.3.4. Papillarmuskeln

Die Papillarmuskeln sind längliche, kegelförmige Ausstülpungen des Myokards in den Ventrikel zur Öffnung der Segelklappen über Sehnenfäden (*Chordae tendineae*). Sie sind im Schnitt circa 2-4 mm lang. Im rechten Ventrikel sind drei Papillarmuskeln zur Öffnung der Trikuspidalklappe vorhanden. Im linken Ventrikel befinden sich zwei Papillarmuskeln zur Öffnung der Mitralklappe. Diese werden als anteriorer und posteriorer Papillarmuskel in Beziehung zur Ventrikelwand bezeichnet. Die Muskelfibrillen sind parallel angeordnet [15]. Da die Okklusion der linken Herzkranzarterie oberhalb der Abgabe des *Ramus proximalis ventriculi sinistri* liegt, ist davon auszugehen, dass der posteriore Papillarmuskel dem *remote* Myokard zuzuordnen ist. Er eignet sich daher aufgrund seiner strukturellen Eigenschaften der Myofibrillen, der definierten Lage und guten Abgrenzung hervorragend als repräsentatives *remote* Myokard.

1.4. Der akute Myokardinfarkt

Als Myokardinfarkt wird ein Ereignis akuter, vollständig unterbrochener oder einer Minderdurchblutung in den Koronararterien und somit verändertem Sauerstoffangebot bezeichnet, in dessen Folge es zum Absterben von Herzmuskelzellen kommt. Anhand der zugrundeliegenden Ätiologie der Mangelversorgung werden insgesamt fünf Typen des Myokardinfarktes unterschieden. Klinisch bedeutsam sind Typ 1 bis 3 [16]. Diese kommen im Wesentlichen entweder durch atherosklerotische oder embolische Verschlüsse, Dissektionen oder ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot zustande [17–19].

1.4.1. Symptomatik des Myokardinfarkts

Die klinische Symptomatik des Patienten reicht von thorakalen Schmerzen mit Ausstrahlung in den Rücken, die Schultern und Arme über ein thorakales Druckgefühl bis zu Luftnot, Übelkeit und Erbrechen, Kaltschweißigkeit, Blässe und Oberbauchschmerzen. Diese Symptomatik ist laut der MONICA Studie bei lediglich 40 % der Patienten zu verzeichnen. Bei Diabetikern, älteren Patienten und Frauen sind in bis zu 20 % der Fälle auch asymptomatische Verläufe, sogenannte stumme Ischämien, beschrieben [20–23].

1.4.2. Phasen und Zonen nach Myokardischämie

Nach erfolgtem ischämischem Ereignis und Reperfusion, mittels Koronarangiografie und perkutaner transluminaler koronarer Angioplastik (*PTCA*), unterscheidet man drei Zonen im Myokard: die ischämische Zone, die daran angrenzende Rand-/*Borderzone* und das weiter entfernte nicht-ischämische Gebiet, auch als *remote* Myokard bezeichnet. In dieser Promotion wurde die LAD okkludiert. Folgend wird auf die einzelnen Zonen und Gebiete gesondert eingegangen.

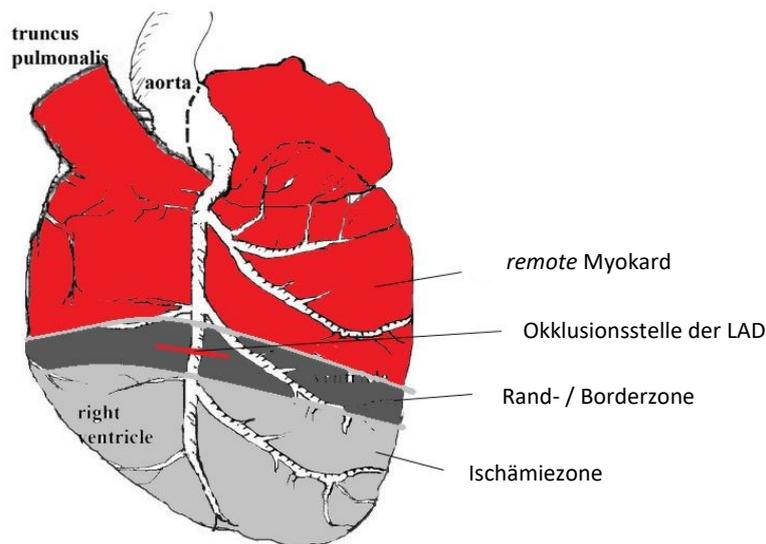


Abb. 4: Schematische Einteilung der Zonen und Gebiete nach Okklusion der LAD am Mäuseherz

(eigene Darstellung, modifiziert nach Yoldas *et al.*, mit freundlicher Genehmigung des Autors [12])
 Rot = remote Myokard. Dunkelgrau = Rand-/Borderzone. Hellgrau = Ischämiezone. Roter Querstrich = Position der Okklusion der LAD.

1.4.2.1. Die Ischämiezone

Unmittelbar nach Okklusion der linken Herzkranzarterie wird das durch diese versorgte Myokard nicht mehr mit Blut perfundiert. In den ersten 12 Stunden kommt es zunächst zu myokardialen Stress und erhöhtem Sauerstoffbedarf. Die Kardiomyozyten verändern ihre Form, nekrotisieren, und die kontraktile Funktion des Myokards in diesem Bereich wird reduziert [24]. Es kommt durch die Hypoxie zu einem anaeroben Stoffwechsel mit einem Kapillarleck und der Einwanderung von Leukozyten. Danach folgen konsekutiv eine akute Inflammation, Apoptose, Nekrose und schließlich die Narbenbildung. Bereits nach 30-45 Sekunden kommt es zu einer systolischen und diastolischen Dysfunktion, entsprechend sichtbar in ST-Strecken-Veränderungen im EKG. Nach 30 bis 40 Minuten kommt es zum Beginn der Nekrose. Abrupt fällt die Konzentration von Adenosintriphosphat (ATP) ab und bei erhöhtem intrazellulärem Natrium und

Wasserstoff entwickelt sich eine Azidose, gekennzeichnet durch einen pH-Wert unter 7,35. Es folgt ein Ausfall der Ionenpumpen; Calcium und Wasser strömen in die Zelle ein. Das Wasser lässt die Zellen anschwellen, mit der Folge einer Ruptur der Zellmembran. Dies aktiviert Phospholipasen wie die Phospholipase A (PLA), die wiederum Membranphospholipide und dann über Arachidonsäure pro-inflammatorische Leukotriene und Prostaglandine aktivieren. Außerdem werden über Lysophosphatide und Lysophosphatidsäure, proinflammatorische Endothelzellen, aktiviert [25].

Die Azidose aktiviert zudem Leukozyten und das Komplementsystem. Die nekrotischen, gestressten und beschädigten Kardiomyozyten sowie die zerstörte extrazelluläre Matrix bilden Gefahrensignale, sogenannte *damage-associated molecular patterns* (DAMPs). Diese binden an *pattern recognition receptors* (PRRs) der überlebenden Parenchymzellen und begünstigen die Einwanderung der Leukozyten und Komplementfaktoren. Es beginnt die inflammatorische Phase mit der Vermittlung adhäsiver Interaktionen zwischen Leukozyten und Endothelzellen, die den Übertritt von Neutrophilen und Monozyten ermöglichen. Die aktivierten Leukozyten wiederum bilden Interleukine und reactive oxygen species (ROS) [26,27]. Das Ausmaß und die Dauer der Inflammation haben proportionale Auswirkungen auf die Größe des Infarktgebietes, der Randzone und des *remote* Myokards [28].

Eine frühe Reperfusion begünstigt eine niedrigere Mortalität, geringe Infarktgrößen und damit einen geringeren Untergang von Kardiomyozyten und konsekutiver linksventrikulärer HF und reduziert das Ereignis des plötzlichen Herztodes [29,30]. Nach der akuten Inflammationsreaktion folgen die Proliferations- und Reparaturphase, das sogenannte ventrikuläre *Remodeling*.

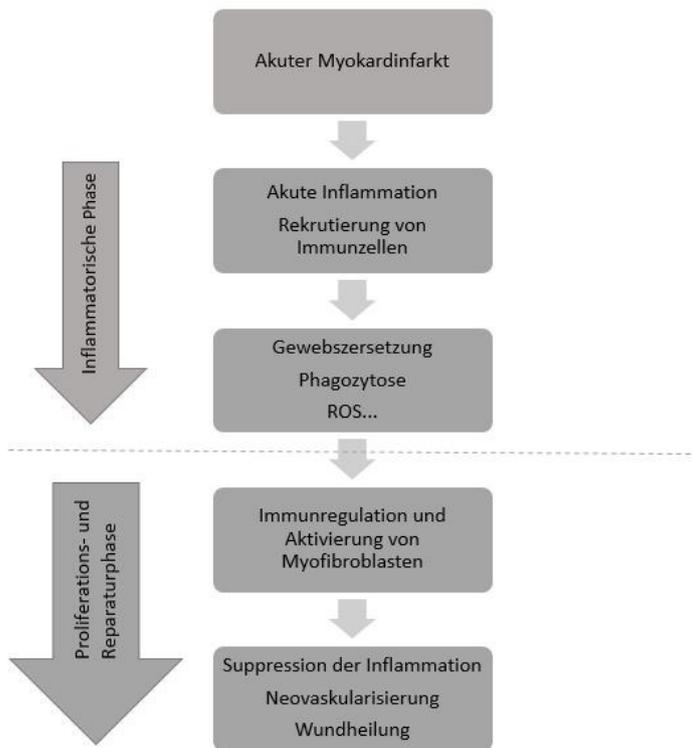


Abb. 5: Schematische Darstellung der Phasen und Mechanismen nach der Ischämie

(eigene Darstellung modifiziert nach [27]).

1.4.2.2. Die Randzone / Borderzone

Unmittelbar angrenzend an das ischämische Gebiet befindet sich die Randzone, an die peripher das nicht ischämische *remote* Myokard grenzt. *Jackson et al.* weisen am Schaf-Modell, trotz einer normalen Perfusion, eine hypokinetische Funktionseinschränkung des Myokards der Grenzzone nach [31]. Die Entfernung vom ischämischen Bereich korreliert hier mit dem Grad der mechanischen Dysfunktion. Histologisch findet sich eine Hypertrophie der Zellen der Randzone. Elektronenmikroskopisch zeigen sich keine

Unterschiede zwischen dem Myokard der Randzone und dem *remote* Myokard. Somit kann eine strukturelle Änderung auf makroskopischer Ebene keine ausreichende Erklärung für die Funktionseinschränkung liefern. Auf molekularer Ebene sind reduzierte Phosphorylierungen der leichten Myosinketten erkennbar [32].

1.4.2.3. Die nicht ischämische Zone (*remote* Myokard)

Die nicht ischämische Zone schließt sich peripher direkt der Randzone an. Dieses Gebiet wird durchgehend mit sauerstoffreichem Blut perfundiert. Somit ist es eigentlich von der Ischämie unbetroffen [33]. Vermuten könnte man eine Funktionssteigerung des *remote* Myokards zur Kompensation des ischämischen Areals. Das Gegenteil ist jedoch der Fall. Mehrere Publikationen haben eine Reduktion der kontraktilen Funktion und eine Erhöhung des Extrazellulärvolumens nachgewiesen [34]. Eine Publikation von *Cheng et al.* konnte über die Messung der koronaren Flussreserve zeigen, dass eine mikrovaskuläre Dysfunktion zu einer Funktionseinschränkung beiträgt [35]. Dies könnte beginnend erklären, wieso es, trotz geringer ischämischer Areale, im Langzeit-Outcome vieler Infarktpatienten zu erhöhter Mortalität im Rahmen einer konsekutiven HF kommt [4,5]. Eine nicht unwesentliche Rolle scheint auch der myozytäre Calciumkreislauf einzunehmen. So konnten *Kronenbitter et al.* an isolierten Kardiomyozyten des *remote* Myokards 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion (I/R), im Vergleich mit der Kontrollgruppe, niedrigere Calciumtransienten detektieren. Ebenso waren die Geschwindigkeiten des zytosolischen Calciumeinstroms und der zytosolischen Calciumelimination reduziert. Als wesentliche Ursache stellten sich eine reduzierte Phospholamban-Phosphorylierung und dadurch eine reduzierte Aktivität der im sarko- und endoplasmatischen Retikulum befindlichen Calciumpumpe (SERCA2a) heraus. Die Sarkomerfunktion zeigte sich auf (sub)-zellulärer Ebene ebenfalls beeinträchtigt. Inwiefern die nicht ischämischen Herzareale in der Frühphase nach Infarkt, auch im intakten Muskelgewebe funktionell beeinträchtigt sind, blieb jedoch unklar und ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit [36].

1.4.2.4. Das ventrikuläre Remodeling

Das ventrikuläre *Remodeling* vollzieht sich in Wochen bis Monaten nach dem Myokardinfarkt. Man unterscheidet eine inflammatorische, proliferative und regenerative Phase. Die inflammatorische Phase ist vor allem gekennzeichnet durch Ereignisse, die unter anderem zum plötzlichen Herztod führen können. Hierunter fallen die Ventrikelruptur mit Perikardtamponade, aneurysmatische Veränderungen oder eine akute Mitralklappeninsuffizienz bei Papillarmuskelaabriss und dadurch ausgelöste maligne Arrhythmien [37]. Mechanischer Stress auf die Myokardwand beeinflusst maßgeblich deren Funktion. Hämozirkulatorische Einschränkungen aktivieren endogene Katecholamine. Hohe Katecholaminlevel sind mit einer größeren myokardialen Gewebeschädigung, erhöhtem Funktionsverlust und daraus resultierend einer höheren Mortalität assoziiert [38]. Funktionell resultiert aus diesen Veränderungen eine Erhöhung der Herzfrequenz (Tachykardie) mit Hyperkinesie des *remote* Myokards. Pathomorphologisch ist, in den ersten etwa 8 Stunden, nur ein leichtes Abblassen bei feuchter, ödematöser Oberfläche zu erkennen. Nach 8 bis 12 Stunden verändert sich die Morphologie, entsprechend den zellulären Mechanismen, zu einer trockenen, über dem Niveau befindlichen, lehmgelben Nekrose. In den folgenden 60 bis 72 Stunden nach Okklusion erfolgt die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten als Zeichen der Inflammation. Diese Phase ist gekennzeichnet durch den höchsten Grad der Nekrose. Die Proliferations- und Reparationsphase beginnt eine bis drei Wochen nach dem Infarkt. Zunächst wandern anti-inflammatorische Zellen ein und supprimieren die Inflammation. Es kommt zur Proliferation von Myo-/Fibroblasten, einer Neovaskularisierung und der Ausbildung von Granulationsgewebe [24,27]. Makroskopisch imponiert vor allem eine unter Niveau befindliche grau rötliche Färbung. Die Reparationsphase ist geprägt von kollagenem und fibrotischem Umbau, Aktivierung der extrazellulären Matrix, Narbenbildung und myozytärer Hypertrophie zur Vermeidung der Dilatation und Stabilisierung der Kontraktilität [28]. Etwa einen Monat nach der Myokardischämie beginnt die Narbenbildung, die sichtbar wird durch eine grau weißliche Färbung mit tastbarer derber Gewebestruktur [8,24]. Auf zellulärer Ebene sind Neutrophile, Monozyten und Makrophagen zur Suppression der Inflammation und damit Eindämmung des myokardialen Gewebsuntergangs verantwortlich. Der narbige

Umbau erfolgt über Myofibroblasten und kontraktile Proteine wie Kollagen und Endothelzellen.

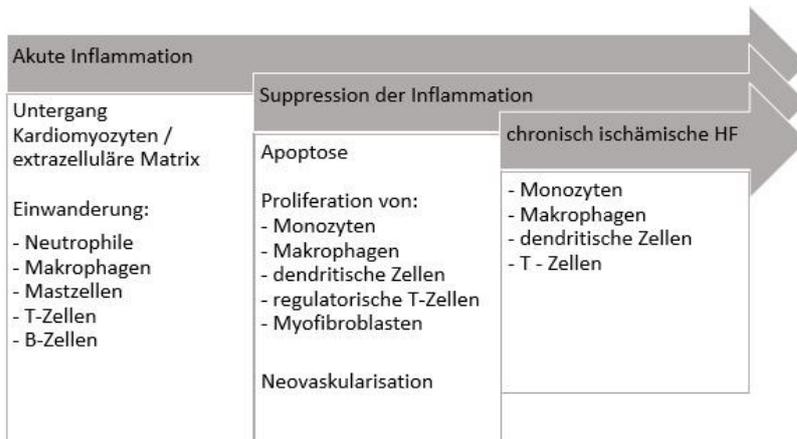


Abb. 6: Zelluläre Mechanismen des *Remodeling*

(eigene Darstellung modifiziert nach [27])

1.5. Das Myokard und die Herzmuskelzelle

Als Myokard bezeichnet man die quer gestreifte Muskulatur des Herzens. Die Muskelfasern sind der Skelettmuskulatur ähnlich, aber erheblich kürzer und dünner [39]. Dabei verlaufen diese longitudinal, zirkulär und schräg, um eine konzentrische Kontraktion in der Systole zu ermöglichen. In den Ventrikeln laufen die Fasern schraubenförmig, in den Vorhöfen u-förmig und horizontal. Im rechten Ventrikel sind zwei, im linken Ventrikel drei Schichten an Muskelfasern vorhanden [40]. Muskelfasern wiederum setzen sich zusammen aus zahlreichen Myofibrillen, deren kleinste Einheit die Sarkomere sind. Viele Sarkomere hintereinander bilden eine Myofibrille. Das Sarkomer besteht im Wesentlichen aus Aktin- und Myosinfilamenten und ist ein funktioneller Bestandteil der zentralständig, einkernigen Herzmuskelzelle. Insgesamt bilden diese Elemente den kontraktilem Apparat. Unterschieden werden zwei Typen von Herzmuskelzellen, die entweder der Arbeitsmuskulatur oder dem

Erregungsbildungssystem angehören. Erstere sind für die Kontraktion des Herzens verantwortlich, zweitere für die elektromechanische Kopplung [41]. Der Kontraktion zugrunde liegt der Querbrückenzyklus. Im Folgenden werden die Sarkomere (Kapitel 1.5.1.) und der Querbrückenzyklus (Kapitel 1.5.2.) näher beleuchtet.

1.5.1. Die Sarkomere

Das Sarkomer ist innerhalb der Herzmuskelzelle die kontraktile und damit kleinste funktionelle Einheit des Muskels. Es setzt sich aus drei Proteingruppen zusammen

- den kontraktilen Proteinen – Aktin und Myosin
- den Verankerungsproteinen, wie z. B. Titin sowie
- den Regulatorproteinen Troponin und Tropomyosin.

Elektronenmikroskopisch ersichtlich sind aneinandergereihte helle und dunkle Banden. Die Helligkeit ist abhängig von der Lichtbrechung. Je weniger überlappende Elemente vorhanden sind, desto heller erscheint die Bande. Die Z-Scheiben (Zwischenscheiben) sind Zwischenmembranen aus Gerüstproteinen und begrenzen das Sarkomer zu beiden Seiten. Mittig dazwischen befindet sich der M-Streifen. Die daran angrenzenden Banden kennzeichnen den H-Streifen. Beidseitig gefolgt von der A-Bande, die aufgrund einer optischen Anisotropie unter polarisierendem Licht eine Doppelbrechung erfährt und daher dunkel erscheint. Die I-Bande, angrenzend an die Z-Scheibe, verdankt ihren Namen der Isotropie (einfachen Lichtbrechung) [39,42].

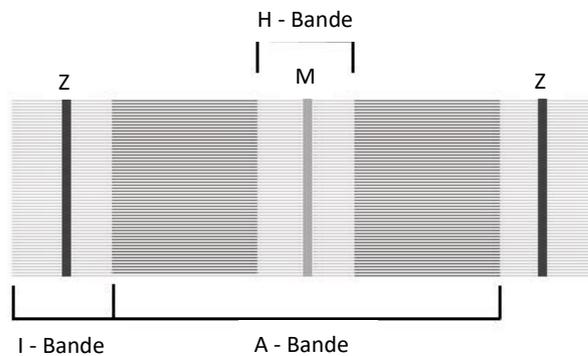
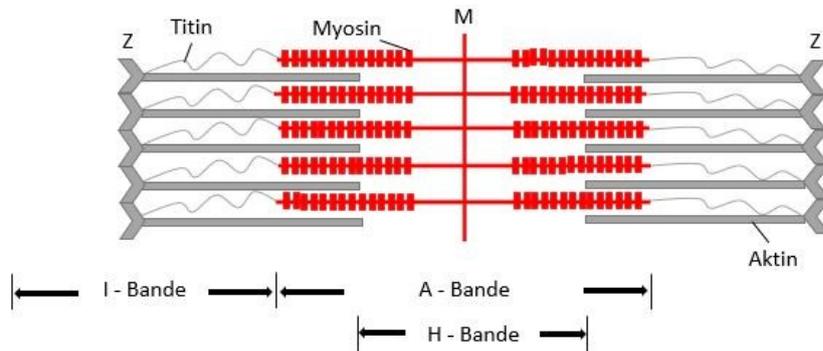


Abb. 7: Schematische Darstellung des Sarkomers

(eigene Darstellung). Z = Z-Scheibe, M = M-Linie

Auf filamentärer Ebene sind die Sarkomere wie folgt aufgebaut. Die Basis der Z-Scheiben bildet das Proteinmolekül α -Aktinin, das von Desmin umgeben ist, welches die Myofibrillen mit der Muskelzellmembran, dem Sarkolemm, verbindet. Der Z-Streifen beinhaltet das α -Aktinin und das Kappenprotein CapZ am Ende des Aktinfilaments. Dabei vernetzen diese beiden Proteine die Aktinfilamente miteinander. Am Minusende, zur M-Linie hin, bildet Tropomodulin das Kappenprotein. Die Aktinfilamente gehören zu den dünnen Filamenten und erscheinen daher hell im Bereich der I-Bande. Die H-Bande ist frei von Aktin.

Relaxation



Kontraktion

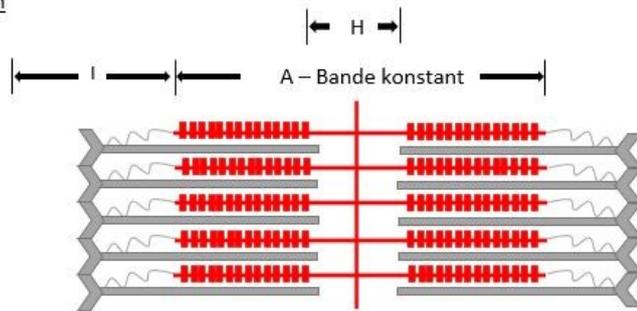


Abb. 8: Schematische Darstellung der Sarkomere auf filamentärer Ebene

(eigene Darstellung, modifiziert nach [43])

Z = Z-Linie, M = M-Linie. Während der Kontraktion verkürzen sich die I-Banden und H-Zonen. Die A-Bande bleibt konstant.

Grundlage der Aktinfilamente sind viele aneinander gelagerte Aktin-Monomere (G-Aktin), die sich zu einer α -Helix anordnen [39]. Jede Windung beinhaltet 207 Aktin-Monomere, die dann das filamentäre (F-)Aktin bilden. Tropomyosinmoleküle sind fadenförmige Doppelmoleküle aus einer α - und einer β -Untereinheit. Sie lagern sich fadenförmig in die Furche der beiden helikalen Aktinstrukturen ein. Dabei überbrückt ein Tropomyosinfaden sieben Aktine. In regelmäßigen Abständen binden zudem drei verschiedene Troponine (T, C und I) im Komplex an Tropomyosin. Troponin T ist für die

direkte Bindung an Tropomyosin, Troponin C für die Bindung von Calcium-Ionen und Troponin I für die Calcium-abhängige Bindung an Aktin zuständig [41].

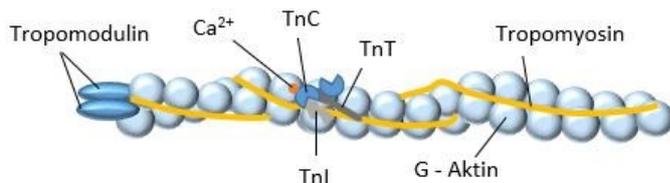


Abb. 9: Schematische Darstellung des Aktinfilaments mit dem Troponinkomplex

(eigene Darstellung modifiziert nach [41,43,44]) Ca^{2+} = Calciumionen, TnI = Troponin I, TnC = Troponin C, TnT = Troponin T.

Im Bereich der A-Bande überlagern sich die dünnen Aktinfilamente mit den dicken Myosinfilamenten. Diese Bande ist stabil und erfährt keine Längenänderung. Das Myosinfilament besteht aus etwa 300 Myosinmolekülen. Das Myosinmolekül selbst setzt sich aus sechs aneinander gelagerten Peptidketten zusammen. Zwei Peptidketten sind schwere α -helikale Ketten, die den Schwanz, den beweglichen Hals und den Kopf bilden. Nach dem beweglichen Hals spalten sich die zwei schweren Ketten und enden in je einem Kopf. Der Kopf setzt sich dabei zusammen aus dem Hebelarm und der katalytischen Domäne. Den zwei Hebelarmen angelagert sind jeweils zwei leichte Ketten, die als essenzielle und regulatorische Kette unterschieden werden. Ein Konverter, eine Art vermittelnde Komponente, verbindet den Hebelarm mit der katalytischen Komponente. Diese beherbergt ein aktives Zentrum für eine durch Calcium aktivierte ATPase. Ein Enzym, welches ATP zu Adenosindiphosphat (ADP) und anorganischem Phosphat hydrolysiert. Am Ende des Kopfes sorgt eine Querbrücke (vgl. Kapitel 1.5.2.) für die Bindung an Aktin.

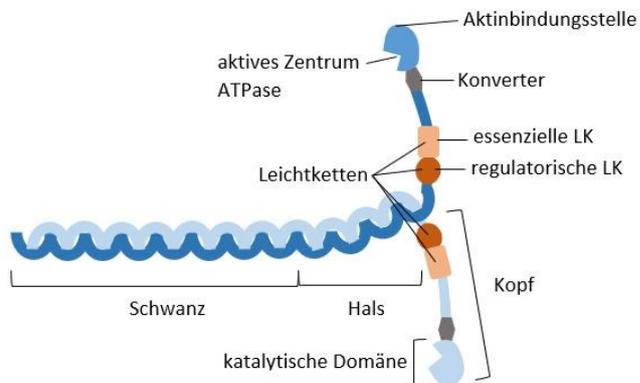


Abb. 10: Schematische Darstellung des Myosinmoleküls

(eigene Darstellung, modifiziert nach [39,43])
 LK = Leichtkette

Zwischen der Z-Scheibe und der M-Linie sind die Myosinfilamente über ein elastisches Molekül namens Titin, als Inhibitor einer Überdehnung, implementiert. Das Titinmolekül dient dabei der Zentrierung des Myosinfilaments gegenüber dem Aktinfilament. Weiterhin besitzt es passive Rückstellkräfte, die den Muskel befähigen, sich nach der Dehnung wieder zusammenzuziehen und seine Gleichgewichtslänge zu erreichen. Die ruhenden Muskeln lebender Organismen haben bereits eine Vordehnung über die Gleichgewichtslänge erfahren [41,43].

1.5.2. Der Querbrückenzyklus

Als Querbrückenzyklus werden die Verkürzung der Sarkomere und die daraus entstehende mechanische intramuskuläre Kontraktion, durch eine zyklische Interaktion der Aktin- und Myosinfilamente, bezeichnet. Er beginnt mit einem freien aktiven Zentrum am Myosinkopf ohne Bindung von ATP an die hydrolysierende ATPase. In diesem Zustand ist die Aktinbindestelle des Myosins fest mit Aktin verbunden. Im ersten Schritt bindet ATP am Myosinkopf, wodurch sich die Aktin-Myosin-Bindung im zweiten Schritt löst und das Myosinmolekül in seine Ausgangskonformation zurückführt.

Der Winkel vom Hebelarm zum Kopfteil beträgt 50 Grad. Im dritten Schritt kann die am freien aktiven Zentrum des Myosinkopfes ständige ATPase das dort gebundene ATP zu ADP und anorganischem Phosphat hydrolysieren. Dieser Vorgang führt zu einer Lageveränderung des Hebelarmes mittels des Konverters. Der Winkel erweitert sich entsprechend auf 90 Grad. Im vierten Schritt bindet Calcium an Troponin C am Aktinfilament und bewirkt eine Konformationsänderung des Myosinkopfes. Dieser wandert zu einem benachbarten G-Aktin-Molekül in Richtung der Z-Linie. Bei einer ausreichend hohen Calcium-Konzentration von $\geq 1 \mu\text{M}$ kann im fünften Schritt eine feste Bindung des Myosinkopfes an das Aktinmolekül erfolgen. Dies impliziert im sechsten Schritt erneut eine Konversion des Hebelarmes mithilfe des Konverters und das anorganische Phosphat, dissoziiert aus dem aktiven Zentrum. Diese Konformationsänderung und die Energie des freien Phosphates bewirken ein Gleiten der Filamente von 6 bis 8 nm übereinander, den ersten Kraftschlag. Der Winkel vom Myosin-Hals zum Kopf verringert sich auf 50 Grad. Im siebten Schritt dissoziiert auch das ADP vom aktiven Zentrum, wodurch eine weitere Lageveränderung des Hebelarmes am Konverter hervorgerufen und Energie frei wird. Der zweite Kraftschlag wird eingeleitet und verschiebt die Aktin- und Myosinfilamente um 2 bis 4 nm gegeneinander. Dieser Vorgang wird als Gleitfilamenttheorie nach Huxley und Henson bezeichnet. Es folgt eine erneute zyklische Abfolge des Querbrückenzyklus [39,41,43].

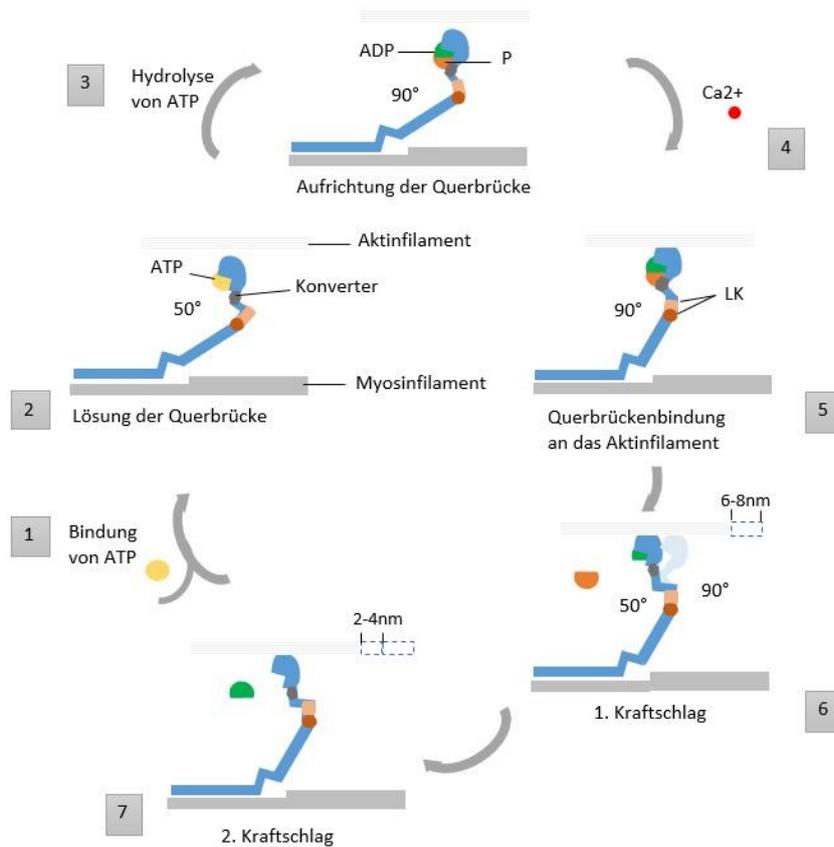


Abb. 11: Schematische Darstellung des Querbrückenzyklus

(eigene Darstellung, modifiziert nach [39,41,43])

ATP (gelb) = Adenosintrophosphat, ADP (grün) = Adenosindiphosphat, P (orange) = Phosphat, LK = Leichtketten, Ca^{2+} = Calciumkonzentration

1.5.3. Kraft – Längen – Relation der Muskelmechanik

Die Parameter der Muskelmechanik beinhalten die Muskelkraft bzw. -last sowie die Muskelverkürzung mit Verkürzungs- und Dehnungsgeschwindigkeit. Dargestellt wird diese Beziehung im Arbeitsdiagramm des Muskels.

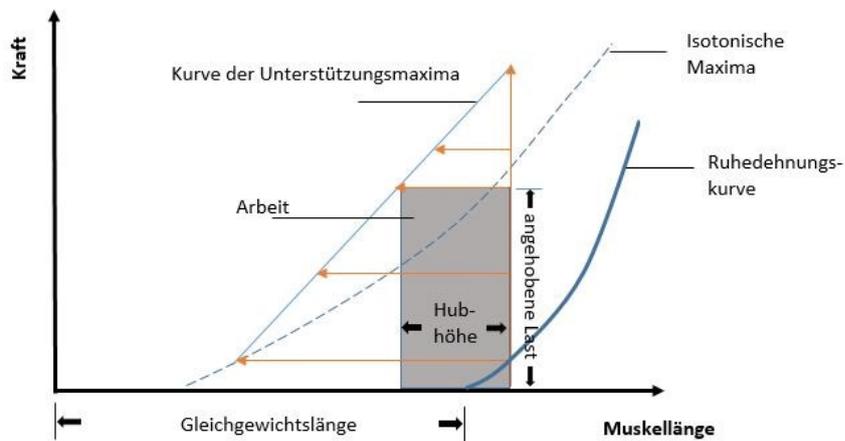


Abb. 12: Arbeitsdiagramm des Skelettmuskels

(eigene Darstellung, modifiziert nach [43])

Jeder Muskel hat eine Ruhelänge, die er im Gesamtverband des Muskelbündels einnimmt, und eine Gleichgewichtslänge, die dieser nach Isolation ohne Erregung einnimmt. Die Gleichgewichtslänge ist häufig etwas kürzer als die Ruhelänge. Anhand der Ruhe-Dehnungs-Kurve wird ersichtlich, dass der Muskel nach Dehnung über die Gleichgewichtslänge hinaus das Bestreben hat, sich zusammenzuziehen. Diesen Umstand bezeichnet man als passive Rückstellkraft, die im Wesentlichen über die Freilegung von Titinmolekülen gesteuert wird (Kapitel 1.5.1.). Für diese Arbeit entscheidend ist vor allem die Kurve der isotonischen Maxima. Sie visualisiert die konstante Kraftentwicklung unter gleichbleibender Last bzw. Vordehnung [43].

1.6. Die Regulation der Herzfunktion

Das Myokard des Herzens besitzt verschiedene Mechanismen, um das Herzzeitvolumen und damit den Blutfluss und Kreislauf des Menschen zu regulieren. Das Herzzeitvolumen bezeichnet dabei die Menge an Blut, die das Herz in einer bestimmten Zeit pumpt. Üblicherweise wird sie in Liter pro Minute angegeben und beträgt etwa 5l/min. Die Regulation erfolgt entweder über die Herzfrequenz oder das Schlagvolumen. Beide

Parameter werden im Wesentlichen über drei Mechanismen geregelt. Diese sind zum einen der Frank-Starling-Mechanismus, auf den in Kapitel 1.6.1. gesondert Bezug genommen wird, sowie zum anderen das vegetative Nervensystem mit Sympathikus und Parasympathikus und kardiale Reflexe. Das vegetative Nervensystem reguliert dabei die Herzfrequenz (Chronotropie), die Kontraktionskraft (Inotropie), die Reizleitungsgeschwindigkeit am AV-Knoten (Dromotropie), die Erregbarkeit der Myozyten (Bathmotropie) und die Relaxationsgeschwindigkeit (Lusitropie). Auf die kardialen Reflexe wird nicht näher eingegangen, da sie für diese Arbeit keine größere Relevanz besitzen. Relevant für diese Dissertation sind im Wesentlichen der Frank-Starling-Mechanismus, die positive und negative Inotropie (Kraftamplitude, Kraftzu- und abnahme), die positive Chronotropie und die positive Lusitropie [43,45].

1.6.1. Der Frank–Starling–Mechanismus

Der Frank-Starling-Mechanismus beschreibt die physiologischen Regulationsmechanismen des linken Herzens hinsichtlich akuter Druck- oder Volumendifferenzen. Er besagt, dass eine Volumenbelastung des Herzens (erhöhte Vorlast) mit einer Steigerung seiner Auswurfleistung beantwortet wird. Die Vorlast resultiert aus Mechanismen bzw. Pathologien vor dem Herz. Erhöhte Drücke hinter dem Herz, ab dem aortalen Ausflusstrakt, und eine daraus im linken Ventrikel resultierende Druckbelastung, finden sich im Begriff der Nachlast. Das Herz ist bestrebt, das Herz-Zeit-Volumen (HZV) konstant zu halten. Das linksventrikuläre Schlagvolumen, beträgt beim Menschen in Ruhe in etwa 70-90 ml bei einem linksventrikulären Druck von 100 – 120 mmHg. Aus einem gesteigerten venösen Rückfluss und damit verbundener Vorlasterhöhung resultiert (im physiologischen Rahmen) ein höheres Schlagvolumen, weil der Überlappungsbereich der Aktin- und Myosinfilamente bei moderater Dehnung optimiert wird, was eine effizientere und stärkere Kontraktion ermöglicht. Eine Druckerhöhung, beispielsweise beim Vorliegen einer arteriellen Hypertonie, führt zu kurzzeitig niedrigeren Schlagvolumina, da der linke Ventrikel das Blut gegen einen höheren Widerstand auswerfen muss [43].

In dieser Promotion wird die Kraftentwicklung der Papillarmuskeln als repräsentatives *remote* Myokard unter erhöhter Vordehnung ermittelt, gemäß des von Otto Frank (1895) und Ernest Starling (1926) beschriebenen Prinzips, dass eine, in einem gewissen Bereich erhöhte Vordehnung zu einer höheren Muskelkraft führt. Dieser Zusammenhang ist schematisch in Abbildung 13 dargestellt, wobei die Vorspannung durch angehängte Gewichte (1, 3 und 5 g) variiert wurde. Die Amplitude, entsprechend der maximalen Kraft (F), ebenso wie die Geschwindigkeit der Kraftentwicklung und des Kraftabfalls (dF/dt) erhöhen sich unter steigender Vordehnung [46,47].

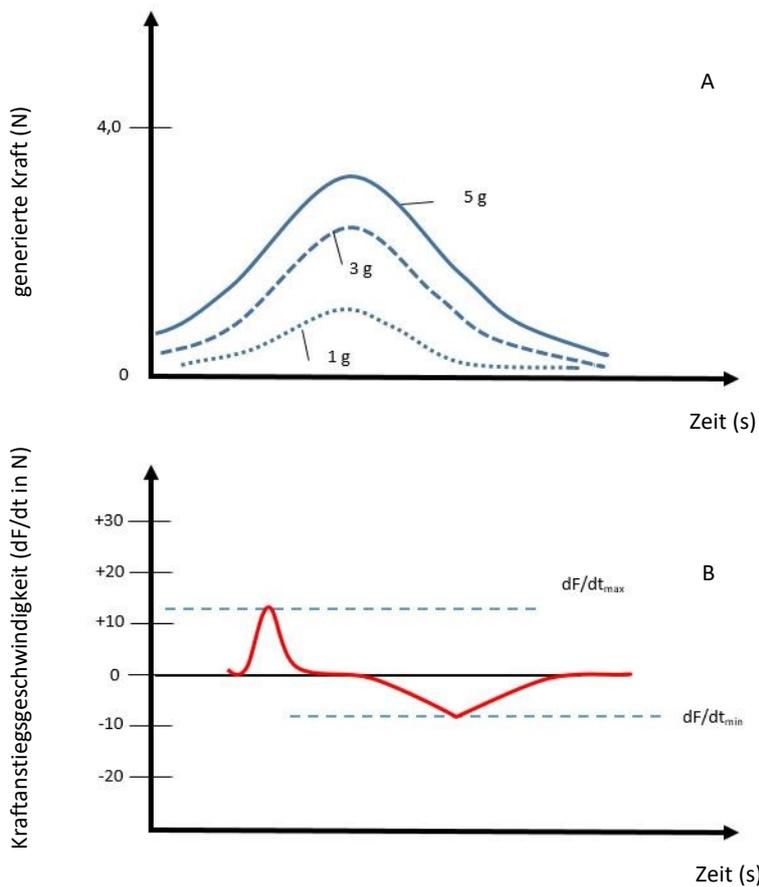


Abb. 13: Inotropie-Mechanismen von Papillarmuskeln unter Vorspannung

(eigene Darstellung, modifiziert nach [43]).

Abbildung A: Vordehnung von Papillarmuskeln mit Gewichten von 1 bis 5 g und die daraus resultierende Kraftentwicklung (F).

Abbildung B: Erste Ableitung von Abbildung A mit Darstellung der Kraftanstiegsgeschwindigkeit im Verlauf der Zeit. dF/dt_{max} = Maximum der Kraftanstiegsgeschwindigkeit. dF/dt_{min} = Maximum der Kraftabfallgeschwindigkeit

Neben dem mechanischen Stress wurden in dieser Arbeit die Papillarmuskeln pharmakologisch stimuliert mittels beta-adrenerger Stimulation. Unter der Zugabe von Noradrenalin zeigt sich eine Steigerung der Kraft und der Kraftanstiegsgeschwindigkeit (Abb. 14).

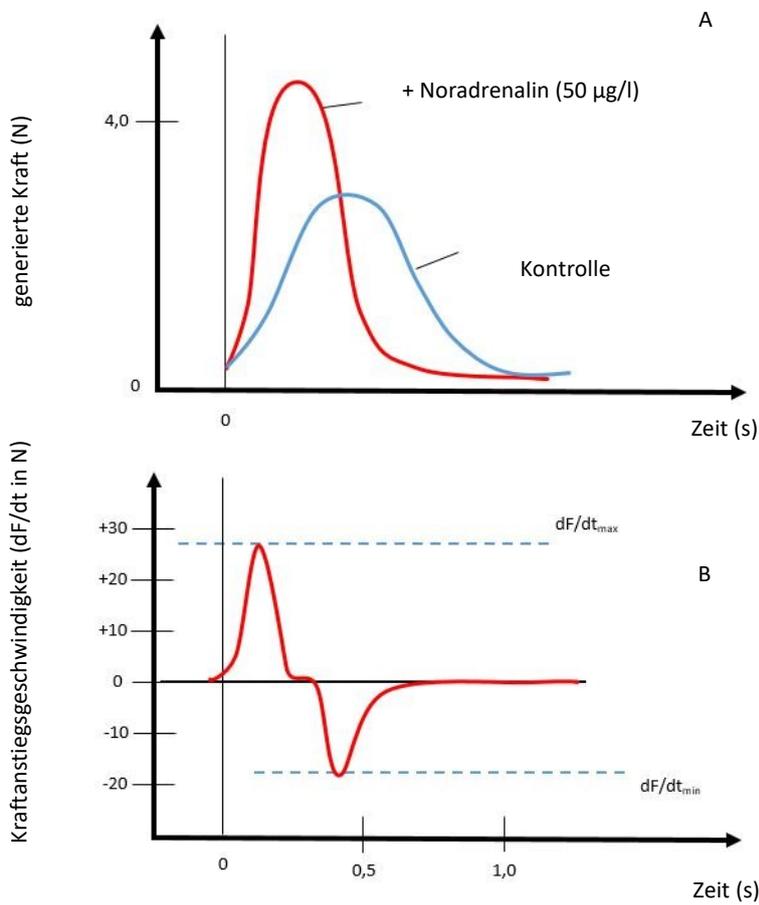


Abb. 14: Inotropie-Mechanismen von Papillarmuskeln unter Zugabe von Noradrenalin

(eigene Darstellung, modifiziert nach [43]).

Abbildung A: Zugabe von Noradrenalin mit 50 µg/l und die daraus resultierende Kraftentwicklung.

Abbildung B: Erste Ableitung von Abbildung A mit Darstellung der Kraftanstiegsgeschwindigkeit im Verlauf der Zeit. dF/dt_{max} = Maximum der Kraftanstiegsgeschwindigkeit. dF/dt_{min} = Maximum der Kraftabfallgeschwindigkeit.

1.6.2. Der Sympathikus am Herzen

Das sympathische Nervensystem ist Bestandteil des vegetativen Nervensystems. Als Transmitter dient im Wesentlichen das Katecholamin Noradrenalin, welches an alpha- und beta-adrenerge Rezeptoren des Herzens bindet (vgl. Kapitel 1.6.6.). Die Effekte bestehen in einer Steigerung der Herzfrequenz (Chronotropie), der Kontraktionskraft (Inotropie) und der Relaxationsfähigkeit (Lusitropie). Der experimentelle Teil dieser Arbeit beruht auf diesen Mechanismen.

1.6.2.1. Positive Inotropie

Die Kontraktionskraft des Myokards kann über zwei Mechanismen reguliert werden. Zum einen die Muskellänge (Kapitel 1.5.3., Abbildung 12) und zum anderen die Aktivierung des Sympathikus über Katecholamine. Anhand von Abbildung 12 ist ersichtlich, dass mit steigender Dehnung des Muskels die muskuläre Kraftentwicklung zunimmt. Die Wirkweise der endogenen, oder wie in dieser Arbeit exogen zugeführten Katecholaminen, wird in Kapitel 1.6.4 näher beleuchtet.

1.6.2.2. Lusitropie

Die Lusitropie bezeichnet die Beeinflussung der Relaxationsgeschwindigkeit des Myokards. An diesem Mechanismus sind ebenfalls Katecholamine wesentlich beteiligt.

1.6.2.3. Chronotropie

Als Chronotropie bezeichnet man die Beeinflussung der Herzfrequenz. Letztere wird reguliert über die Geschwindigkeit der Erregungsbildung im Sinusknoten. Positiv chronotrop wirken Katecholamine. Mit zunehmender Herzfrequenz werden die Zeitintervalle von Systole und Diastole verkürzt.

1.6.3. Die Schrittmacherzelle

Die Schrittmacherzellen des Sinusknotens gehören zu den primären Schrittmacherzellen. Sekundäre und tertiäre Schrittmacherzellen findet man in den nachfolgenden Stationen des Erregungsbildungssystems, dem AV-Knoten und dem His-Bündel. Die Schrittmacherzellen sind spezialisierte Herzmuskelzellen eines autonomen Systems mit spontaner Depolarisationsfähigkeit. Sie erzeugt über Ionenströme elektrische Signale, die auf die Myokardzellen weitergeleitet werden. Letztere implementieren dann einen koordinierten Ablauf der Kontraktion und Relaxation und damit Systole und Diastole [48].

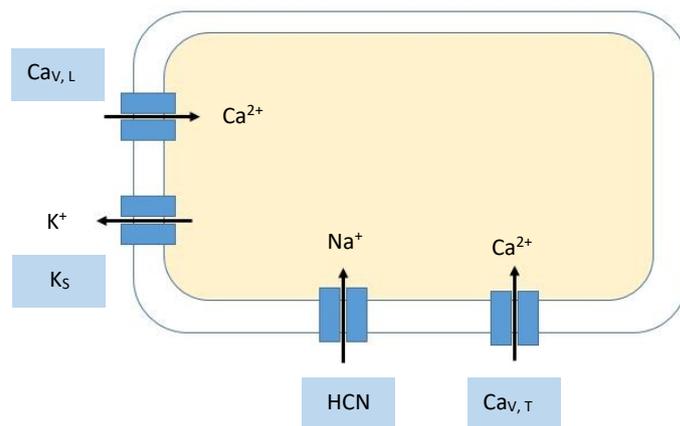


Abb. 15: Schematische Darstellung der Schrittmacherzelle des Sinusknotens

(eigene Darstellung, modifiziert nach [49]).

$Ca_{v,L}$ = spannungsabhängiger L-Typ-Calciumkanal. $Ca_{v,T}$ = spannungsabhängiger T-Typ-Calciumkanal. HCN = *hyperpolarization-activated cycling nucleotide-gated channel*. K_s = auswärtsgerichteter Kaliumkanal. K^+ = Kaliumion. Ca^{2+} = Calciumion. Na^+ = Natriumion.

1.6.4. Das Schrittmacher-Aktionspotential

Das Schrittmacher-Aktionspotential ist ein elektrisches Signal, welches von den Schrittmacherzellen des Sinusknotens ausgeht. Im Gegensatz zu den Herzmuskelzellen besitzen Schrittmacherzellen kein Ruhepotential. Nach einem vorherigen Aktionspotential hyperpolarisiert die Zelle. In der Diastole wird das maximale diastolische Potential am Ende der Repolarisationsphase mit -60 mV erreicht. Diese Hyperpolarisation bewirkt die Öffnung des If-Kanals der Gruppe der *hyperpolarization-activated cycling nucleotide-gated channel* (HNC) mit dem Einstrom von Natrium-Ionen. Unterstützt wird dieser Einstrom ab etwa -50 mV durch die Öffnung spannungsabhängiger T-Typ-Calciumkanäle. Der Einstrom von positiv geladenen Natrium- und Calcium-Ionen hebt das Membranpotential weiter an. Ab -40 mV öffnen sich spannungsabhängige Calciumkanäle vom L-Typ, die das Membranpotential über das Schwellenpotential anheben. Eine Depolarisation bis $+20$ mV wird dadurch hervorgerufen und das Schrittmacherpotential ausgelöst. Mit dem Schluss der L-Typ-Calciumkanäle wird die Repolarisation eingeleitet. Über auswärtsgerichtete Kaliumkanäle strömt Kalium aus dem Zellinneren in den Extrazellulärraum. Das Membranpotential verschiebt sich entsprechend, bis die Hyperpolarisation bei -60 mV erreicht wird. Dieses Membranpotential bewirkt den Schluss der Kaliumkanäle und die nächste Depolarisationsphase kann eingeleitet werden [41,43,45,48].

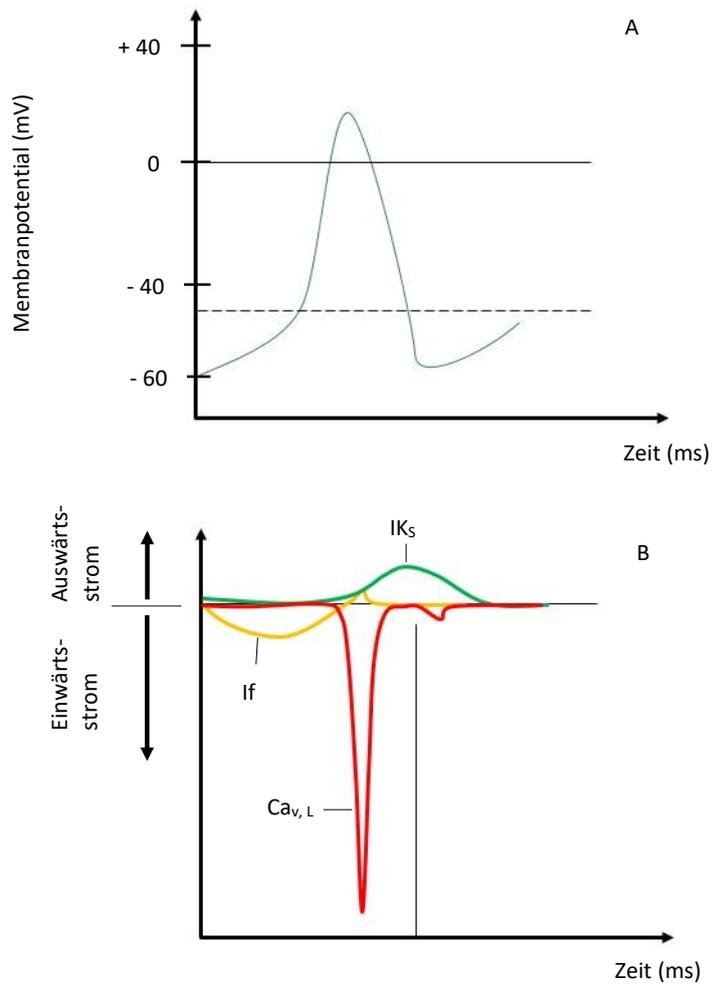


Abb. 16: Das Schrittmacher-Aktionspotential und die damit assoziierten Ionenströme

(eigene Abbildung modifiziert nach [43,50]).

Abbildung A: Schrittmacher-Aktionspotential.

Abbildung B: Zeitlich zum Aktionspotential assoziierte Ionenströme. I_{Ks} = auswärtsgerichteter langsamer Kaliumkanal. I_f = funny channel (Natriumeinstrom). Ca_{v,L} = spannungsabhängiger L-Typ-Calciumkanal.

1.6.5. Das Herzmuskelzellen-Aktionspotential

Herzmuskelzellen besitzen ein stabiles Ruhepotential von -85 mV . Es wird bestimmt durch spannungsabhängige einwärtsgerichtete Kaliumkanäle (K_{ir}) mit hoher Leitfähigkeit. Daher entspricht das Ruhemembranpotential nahezu dem Kaliumgleichgewichtspotential. Die Reizauslösung des Sinusknotens und Fortleitung über das Erregungsbildungssystem via *gap junctions* führt zur Depolarisation bis zum Schwellenpotential von -65 mV . Exogene elektrische Reize, wie in Kapitel 2.2.1., stimulieren diese Reizauslösung der Schrittmacherzellen des Sinusknotens. Nun öffnen schnelle spannungsabhängige Natriumkanäle für $1\text{-}2\text{ ms}$ und heben durch Natriumeinstrom das Membranpotential mit einer Überpolarisation bis $+40\text{ mV}$ an. Der schnelle Natriumeinstrom mit Überpolarisation ist bedingt durch hohe Konzentrationsunterschiede von Natrium, intra- und extrazellulär. Intrazellulär beträgt die Natriumkonzentration etwa 12 mmol/l , extrazellulär 145 mmol/l . Gleichzeitig kommt es zum Schluss der einwärtsgerichteten Kaliumkanäle. Die Steilheit des Kurvenanstiegs der Depolarisation korreliert direkt mit der Geschwindigkeit des Natrium-Einstroms. Der Herzmuskel kontrahiert. Nach dem Erreichen des Membranpotentials von $+40\text{ mV}$ schließen die Natriumkanäle wieder. Diese sind nun refraktär geschlossen, bis die Repolarisation ein Membranpotential unter -50 mV generiert. Kurzfristig folgt danach die Öffnung eines Kalium- und Chloridkanals zur partiellen Repolarisation bis zum Plateau-Potential von 0 mV . Bereits bei -40 mV öffnen sich parallel spannungsabhängige Calciumkanäle, die einen langsamen Einstrom und eine weitere Depolarisation ermöglichen. Dieser Einstrom begünstigt die weitere Freisetzung von Calcium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR). Die Elimination des Calciums zur Rückstellung und Einleitung der Repolarisation erfolgt über einen Natrium-Kalium-Austauscher und Calcium-ATPasen. Dies führt zur Relaxation des Herzmuskels. Die Repolarisationsphase ist gekennzeichnet durch die langsame Abnahme der Calciumleitfähigkeit und des Kaliumausstroms aus der Zelle über verzögerte auswärtsgerichtete Kaliumkanäle. Das Membranpotential nähert sich wieder dem Ruhemembranpotential von -85 mV , unterstützt durch die begleitende Öffnung von einwärtsgerichteten Kaliumkanälen [43,48].

Die elektromechanische Koppelung beschreibt den Vorgang der Übertragung des im Sinusknoten generierten Reizes auf die Myokardzellen, die via *gap junctions* als funktionelles Synzytium operieren. So wird der im Sinusknoten entstandene Reiz entlang des Erregungsleitungssystems des Herzens auf Kardiomyozyten übertragen, die diesen elektrischen Reiz Zelle für Zelle weiterleiten, bis das gesamte Myokard erregt ist. Dadurch kann die Ventrikelkontraktion erfolgen. Von essenzieller Bedeutung ist die Konzentration des zytosolischen Calciums. In einem Calcium-freien Milieu setzt eine elektromechanische Entkopplung ein. Der Einfluss von Katecholaminen auf Betarezeptoren der Herzmuskelzellen sowie der myozytäre Calciumkreislauf sind daher Gegenstand der folgenden Kapitel.

1.6.6. Adrenorezeptoren und Calcium-Cycling

Die Adrenorezeptoren sind Bestandteil der über das sympathische vegetative Nervensystem und über Katecholamine wie Noradrenalin/Norepinephrin oder Adrenalin/Epinephrin/Isoproterenol vermittelten Signalkaskade. Es handelt sich um transmembranäre Rezeptoren, die nach Bindung von Katecholaminen eine Signalkaskade auslösen. Sie werden unterschieden in α - und β -adrenerge Rezeptoren und diese wiederum in Subgruppen. Von den α -Rezeptoren existieren zwei große Untergruppen, die α_1 - und α_2 -Rezeptoren. Die β -Rezeptoren werden in 4 Untergruppen, β_1 bis β_4 , unterteilt. Die Signalkaskaden beider Rezeptorgruppen führen zu verschiedenen Reaktionen des Myokards. Sie beeinflussen die Muskelkraft in der Systole, die Relaxation in der Diastole, die Herzfrequenz (Chronotropie), die Erregungsleitungsgeschwindigkeit und die Regulierung der Reizschwelle.

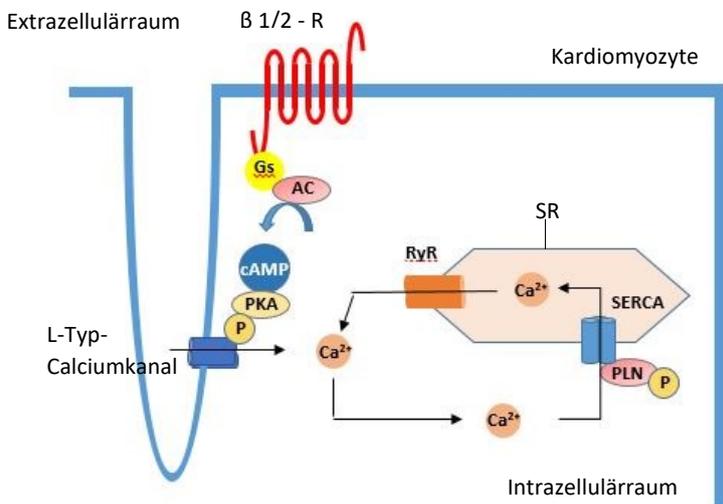


Abb. 17: Schematische Darstellung der über β -Rezeptoren vermittelten Signalkaskaden und des myozytären Calciumkreislaufs

(eigene Darstellung). β 1/2 - R = β 1 bzw. 2-Rezeptor. Gs = G-Protein s. AC = Adenylatcyclase, cAMP = zyklisches Adenosinmonophosphat. Ca^{2+} = Calciumion. PKA = Proteinkinase A. PLN = Phospholamban. P = anorganisches Phosphat. SERCA = sarcoplasmic/endoplasmatic reticulum calcium ATPase. RyR = Ryanodin - Rezeptor.

Nach extrazellulärer Bindung von Katecholaminen an den β 1-Rezeptor wird dieser in einen aktivierten Zustand versetzt. Durch Signaltransduktion im Rezeptor wird ein Impuls in das Innere der Zelle zur Aktivierung von G-Proteinen, hier G_s -Proteinen, vermittelt. Diese wiederum aktivieren Adenylatcyclasen, die Adenosin-ATP in zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) umwandeln und folglich den cAMP-Spiegel steigern. Dies führt zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA), die wiederum Calciumkanäle des L-Typs (longlasting) phosphoryliert und damit öffnet. Calcium strömt in die Zelle und bindet an den Troponin-Komplex der Sarkomere, was zur Freilegung der Myosin-Bindungsstellen und somit zur Kontraktion führt. Die Menge des intrazellulären Calciums wird über den Ryanodin-Rezeptor (RyR) am SR reguliert. Für die Beendigung der Kontraktion ist eine Calcium-Pumpe am sarkoplasmatischen Retikulum verantwortlich, die Calcium im Austausch gegen Wasserstoffionen von intrazellulär in das SR verschiebt. Eine wesentliche Rolle spielt hier Phospholamban (PLN), ein Polypeptid, welches in dephosphorylierter Form die Aufnahme von Calcium in das SR

über die SERCA hemmt. Eine PKA-abhängige Phospholamban-Phosphorylierung reduziert diese inhibitorische Wirkung; die SERCA und der Calciumeinstrom in das SR werden beschleunigt. Es kommt zur beschleunigten Relaxation (positive Lusitropie) [51,52].

1.7. Induktion der Myokardischämie am Mausmodell

Im Rahmen der experimentellen Induktion einer Myokardischämie im Mausmodell bedient man sich fast regelhaft der permanenten oder passageren Okklusion der LAD. Dies kann am offenen oder geschlossenen Thorax vollzogen werden. In der Folge kommt es zur Ischämie und im weiteren Verlauf zu Umbaumechanismen auf zellulärer Ebene. Um die Korrelation der Chronologie und die Umbaumechanismen einordnen zu können, werden im Folgenden die verschiedenen Phasen nach Myokardischämie, die Infarktzone sowie die Induktionsmechanismen genauer erläutert.

1.7.1. Experimentelle Induktionsmechanismen

In der Forschung bedient man sich experimenteller Induktionsmechanismen, um möglichst realistisch das Ereignis der myokardialen Ischämie beim Menschen zu rekonstruieren. Am Maus-Modell haben sich im Wesentlichen zwei verschiedene Induktionsmechanismen, entweder am geschlossenen oder geöffneten Thorax, etabliert. Diese sind zum einen das Vornehmen einer permanenten Ligatur und zum anderen der Vorgang induzierter Ischämie und Reperfusion. Nahezu regelhaft wird die linke Herzkranzarterie (LAD) okkludiert. Im Folgenden werden die beiden zuvor genannten Methoden näher erläutert.

1.7.1.1. Permanente Ligatur

Bei dem Ansatz der permanenten Ligatur wird zunächst eine intraperitoneale Analgosedierung der Maus vorgenommen und diese folgend intubiert und beatmet. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgt mit volatilen Anästhetika. Die Maus wird auf einer Heizplatte mit 37 °C gelagert. Zur Eröffnung des Thorax von etwa 1 cm wird die Linie zwischen dem Musculus pectoralis minor und major etwa in Höhe des 3. oder 4. Interkostalraumes gewählt. Anschließend wird das Perikard eröffnet und die linke Herzkranzarterie identifiziert und im Verlauf 2-3 mm unterhalb des linken Atriums ein Faden unterlegt und die LAD durch Zuzug und Vorlegen von drei Knoten okkludiert. In den Protokollen nach *Lugrin et al.* und *Muthuramu et al.* erfolgt die Erfolgskontrolle nur durch Sichtung des ablassenden Myokards [53,54]. Ein Protokoll nach *Johny und Dutta* beschreibt zusätzlich noch ein Elektrokardiogramm (EKG), Echokardiografie, MRT oder Micro-CT als Kontroll-Untersuchungen [55]. In diesem Ansatz erfolgt keine Lösung der Ligatur.

1.7.1.2. Ischämie – Reperfusion

Dieses Modells bedient sich die Wissenschaft aufgrund der Nähe zur Pathogenese beim Menschen hinsichtlich des akuten Myokardinfarkts. Der Unterschied besteht hier allein in der kurzfristigen, möglichst minimalinvasiven Thoraxeröffnung. Eine bedingte Lösung dieser Problematik findet man in der Induktion der Ischämie bei geschlossenem statt geöffnetem Thorax. Die Methodik mit Ischämie und folgender Reperfusion folgt zunächst dem gleichen Vorgehen wie die permanente Ligatur hinsichtlich Narkoseeinleitung und -aufrechterhaltung, Intubation und Beatmung, Lagerung und Eröffnung des Thorax. Die Okklusion der LAD erfolgt ebenso wie zuvor erläutert. Im Anschluss wird jedoch die Ligatur, je nach Ansatz, für alternierende Zeiten aufrechterhalten. Eine der ersten experimentellen Studien an Kleintieren zum Ischämie-Reperfuisionsmodell stammt von *Johns und Olson* aus dem Jahr 1954 [56]. Viele der folgenden Protokolle orientierten sich an eben dieser. Beschrieben werden Ischämiezeiten von 20 bis 60 Minuten mit folgender Reperfuionszeit von 60 bis 120

Minuten [57–60]. Eine Arbeit von *Reffermann et al.* vergleicht im Rahmen verschiedener Ischämie- und Reperusionszeiten das Outcome hinsichtlich systolischem und diastolischem Blutdruck, der Herzfrequenz und der prozentualen Infarktrealgröße. Diese kommen zu dem Ergebnis, dass über alle Gruppen hinweg der systolische sowie der diastolische Blutdruck und die Herzfrequenz im zeitlichen Verlauf abnehmen. Unterschiede ergeben sich jedoch signifikant bei der Infarktgröße, die im Vergleich der Gruppen mit einer Okklusionszeit von 30 Minuten kleiner ist als nach 120 Minuten [61].

1.7.1.3. Geschlossener versus offener Thorax

Die ersten Versuche mit Okklusion der LAD zur Ischämieinduktion erfolgten bei geöffnetem Thorax [56]. Teilweise bedient man sich, je nach Ansatz, dieses Modells auch weiterhin [62]. Insbesondere wenn die Erfolgskontrolle via Sichtung des ablassenden Myokards erfolgt [63–65]. Durch *Nossuli et al.* [66] wurde im Jahr 2000 aber auch erstmalig ein Ansatz zur Induktion bei geschlossenem Thorax verfolgt. Hierbei liegen zwischen der Eröffnung des Thorax, Vorlage des Fadens unter die LAD, Schließung des Thorax und zeitverzögert die Okklusion der LAD durch Zuzug der Ligatur einige Tage Rekonvaleszenz-Zeit. Die Idee dahinter ist, die Protokolle näher an die physiologischen Verhältnisse eines Myokardinfarkts beim Menschen zu bringen. Bereits die Eröffnung des Thorax führt zu einer Inflammationsreaktion durch Freisetzung proinflammatorischer Zytokine [67], Makrophagen und Monozyten [68]. Des Weiteren gibt es auch Hinweise auf eine pro-inflammatorische Reaktion nach Anästhesie und oxidativem Stress [69]. Es ist außerdem bekannt, dass die Ausprägung der inflammatorischen Reaktion nach myokardialer Ischämie die Größe des Infarktrealbereichs sowie das linksventrikuläre *Remodeling* maßgeblich beeinflusst [70]. Die Rekonvaleszenz-Zeit dient somit der Reduktion der Inflammationsreaktion als beeinflussender Störfaktor.

1.7.2. Organbad

Ein Organbad für elektrische und mechanische Studien an myokardialem sowie anderen Geweben zu verwenden, ist bereits seit nahezu einem Jahrhundert etabliert. Eine Wanne aus Plexiglas enthält destilliertes Wasser, dessen Temperatur konstant im physiologischen Bereich um 37 °C gehalten werden kann. In dieser Wanne befinden sich Reagenzgläser. Diese sind gefüllt mit einer Lösung, die den physiologischen Gegebenheiten in vitro hinsichtlich Temperatur, pH-Wert und Elektrolyten entsprechen muss. Über im Bad befindliche geschlossene Schlauchsysteme, angeschlossen an einen externen Behälter mit der Lösung, können die Reagenzgläser gespült und neue frische Lösung zugeführt werden. An der Basis der Reagenzgläser befindet sich eine Vorrichtung zur Zufuhr von Gasen, z. B. Carbogen oder Sauerstoff. Oberhalb des Organbades gibt es ein Ständerwerk mit mehreren, vertikal und horizontal justierbaren Halteapparaten. Hier kann unter anderem die Regulierung der Spannung auf das im Reagenzglas befindliche Gewebe reguliert werden. An diesem Halteapparat ist wiederum ein Messwertaufnehmer befestigt. Er bietet die Möglichkeit zur horizontal schwingenden Befestigung für eine Halterung mit einem definierten Gewicht zur kranialen Befestigung des, an einen Bindfaden angeschlungenen, Gewebes. Benachbart und ebenfalls horizontal findet sich eine feste Halterung, die mit einem Stimulator für elektrische Impulse verbunden ist, worüber eine Frequenzstimulation erfolgen kann. Diese Stimulationselektrode verfügt über zwei Ringe, die als Kathode und Anode dienen. Das zu untersuchende Gewebe befindet sich zwischen Anode und Kathode zur optimalen elektrischen Stimulation. Die Übertragung von Frequenzen und Kraftentwicklung erfolgt demnach vom Gewebe über die geeichte Halterung zum Messwertaufnehmer, der die Daten dann in eine Software zur Dokumentation, Messung und Datenanalyse überträgt. Messbar sind diverse Parameter. Eine Publikation von *Cain et al.* untersucht atriale Trabekel, entnommen unter OP-Bedingungen an Patienten mit stabiler koronarer Herzerkrankung, die sich erstmalig einer kardialen Intervention unterziehen mussten. Unter CO₂-Zufuhr im Organbad wurden dann ischämische Bedingungen für eine Gruppe simuliert. Unter stabiler Frequenz in festgelegter Zeit und Stimulationsfrequenz wurden in beiden Gruppen die Präparate mit verschiedenen Calciumkonzentrationen des Organbades hinsichtlich der prozentualen Kraftänderung im Vergleich zur Baseline

untersucht. Zur Untersuchung der funktionellen Erholung des Myokards nach Ischämie/Reperfusion wurde ebenfalls die prozentuale Kraftänderung im Vergleich zur Baseline über die Zeit ermittelt [71]. Einen ähnlichen Ansatz mit dem gleichen Präparattypus und I/R-Ansatz mittels Argon verfolgten *Kunecki et al.* Diese Publikation hat, ebenfalls im Organbad, die Kontraktionskraft im Verhältnis zur Maximalkontraktionskraft, die Kraftanstiegs- und Kraftabnahmegeschwindigkeit über die Zeit und unter steigenden Morphin-Konzentrationen gemessen [72]. Adaptiert an diese etablierten Modelle wurden in dieser Arbeit unter diversen Stressoren die kontraktile Amplitude und Kraftanstiegs- sowie Kraftabnahmegeschwindigkeit ermittelt und verglichen.

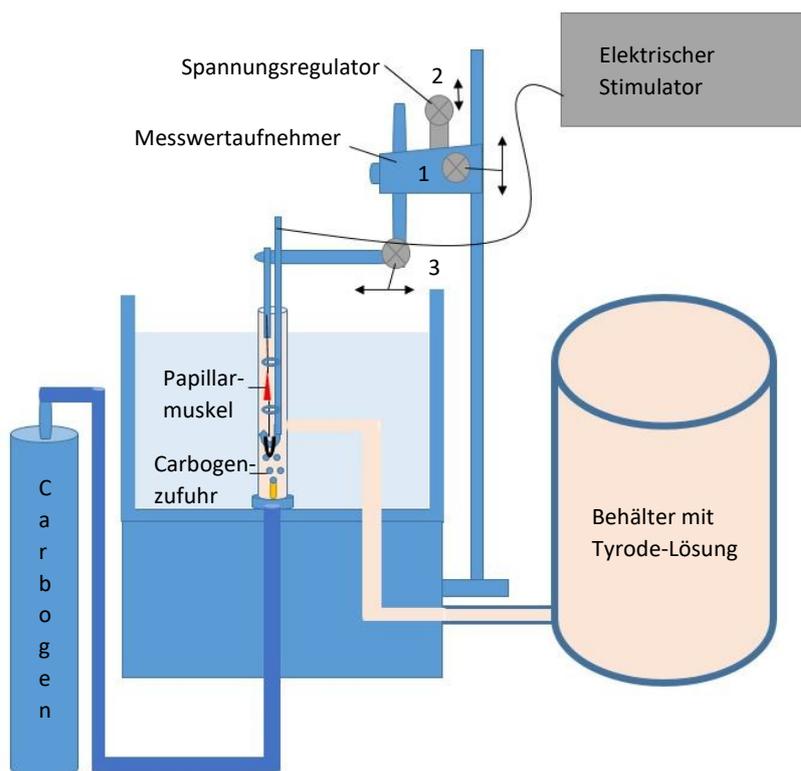


Abb. 18: Schematische Darstellung des verwendeten Organbades

(eigene Darstellung) 1 = Vertikale Höheneinstellung der Messapparatur. 2 = Feine Spannungsregulation für die Vorspannung. 3 = Horizontale Justierung der Messapparatur.

1.8. Fragestellung

Der akute Myokardinfarkt stellt weiterhin die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar [1]. Insbesondere aufgrund der erhöhten 5-Jahres-Sterblichkeit von fast 20 % stellt sich die dringende Frage nach den Mechanismen des ventrikulären *Remodeling* im *remote* Myokard (RM). Zumal diverse Studien Hinweise auf eine Funktionseinschränkung des RM liefern. Diese Funktionseinschränkungen stellen sich langfristig im Sinne einer Hypertrophie oder Dilatation mit konsekutiver HF und Reduktion der EF dar [28,73–75]. Während auf molekularer Ebene im Infarktgebiet diverse Kaskaden der Inflammation, Nekrose, Apoptose und Fibrose aktiviert werden [73], sind derartige Veränderungen im *remote* Myokard weitaus geringer ausgeprägt. Neuere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass der kardiomyozytäre Calcium-Kreislauf während Kontraktion und Relaxation der Myozyten des *remote* Myokards 24 Stunden nach Ischämie und Reperfusion beeinträchtigt ist [38]. Bislang gibt es jedoch kaum funktionelle Studien zur kontraktile Funktion des *remote* Myokards und der veränderten Kraftgenerierung. Es wurden daher anhand isolierter Papillarmuskelpreparate der Maus, die kontraktile Amplituden sowie der Geschwindigkeitsanstieg bei der Kontraktion und der Geschwindigkeitsabfall in der Relaxation ermittelt. Zusätzlich wurden diese Parameter unter pharmakologischem und mechanischem Stress durch Zugabe steigender Konzentrationen von Katecholaminen, Frequenzsteigerung und durch steigende Vorspannungen der Muskelpräparate gemessen.

Konkret wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- Sind Inotropie und Lusitropie im *remote* Myokard in der Akutphase nach Myokardinfarkt reduziert?
- Welchen Einfluss hat beta-adrenerge Stimulation? Können dadurch Beeinträchtigungen der kontraktile Funktion des *remote* Myokards ausgeglichen werden?
- Kann das *remote* Myokard hochfrequente Kontraktion und Relaxation beziehungsweise steigende Vorspannung des Muskels genauso gut kompensieren wie gesundes Myokard?

2. Material und Methoden

2.1. Tierversuche

Die experimentellen Versuche erfolgten am seit langem im Bereich der medizinischen Forschung etablierten Maus-Modell. Die Fütterung und Haltung der Tiere wurde durch die Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben der Heinrich-Heine-Universität (ZETT) standardisiert gewährleistet. Die Genehmigung zur Durchführung erteilte das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) unter dem Aktenzeichen 84-02.04.2013.A122 und 84-02.04.2017.A145. Die Voroperationen führte Prof. Dr. med. J. Schmitt durch. Die Ischämieinduktion vollzog Frau Dr. rer. nat. Annette Kronenbitter. Die fachgerechte Tötung der Tiere sowie die weitere Präparation wurden durch mich, nach Erwerb des Fachkundenachweises gemäß § 9 des aktuellen Tierschutzgesetzes, durchgeführt.

2.1.1. Verwendete Tiere

Die Tiere wurden von der Firma Janvier Labs (Le-Genest-Saint-Isle, Frankreich) erworben. Es handelte sich ausschließlich um männliche Mäuse des Typs C57BL/6J im Alter von ca. 10 Wochen.

2.1.2. Induktion des Myokardinfarkts

Die Voroperation, mit Narkose und Anlage der Fadenschlinge um die proximale LAD bei Mäusen der Ischämie-Gruppe, wurde 72 Stunden vor Induktion der Ischämie durchgeführt. Die Tiere der Sham-Gruppe erhielten eine Thorakotomie ohne Anlage einer Fadenschlinge. Es folgte für die Versuchstiere beider Gruppen eine Rekonvaleszenz-Zeit von 72 Stunden. Die Ischämieinduktion vollzog sich bei geschlossenem Thorax. Die Ischämiezeit betrug 60 Minuten bei den Tieren der Ischämie-Gruppe. 24 Stunden später wurde die fachgerechte Tötung der Tiere beider Gruppen

mit Präparation des Herzens und des posterioren Papillarmuskels vorgenommen. Im Anschluss erfolgten die Experimente zu den oben genannten Fragestellungen.

2.1.2.1. Voroperation der Ischämie-Gruppe

Zur Analgosedierung wurden intraperitoneal Ketamin (60 mg/kg KG) und Xylazin (10 mg/kg KG) injiziert. Die Kontrolle der Narkosetiefe wurde durch Druck auf die Schwanzspitze und Pfoten der Mäuse eruiert. Die Lagerung in Rückenlage auf einer Wärmeplatte mit 37 °C verhinderte das Auskühlen. Es erfolgten die Intubation und Beatmung via Minivent Mircoventilator (Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatur GmbH, March-Hugstetten, Deutschland). Als Beatmungsparameter wurde ein Tidalvolumen von 250 µl bei einer Atemfrequenz von 140/min und einem FiO₂ von 33 % verwendet.

Die Thoraxeröffnung erfolgte zwischen der dritten und vierten Rippe medioclaviculär mit anschließender Eröffnung des Perikards. Die Anlage des Fadens zur Legierung der LAD wurde mittels eines Stereomikroskops der Firma Leica (MZ9.5, Meyer Instruments, Houston, Texas, USA) gewährleistet. Einen Millimeter entfernt von der Spitze des linken Herzohres wurde ein monofiler 7-0 Faden (Prolene™, Johnson & Johnson Ethicon, Norderstedt, Deutschland) unter die linke Koronararterie gelegt. Anschließend erfolgten die Entfernung der Nadel und die Durchführung der beiden Enden durch einen 1 mm dicken Polyethylenring (PE-10), mit Legung einer losen Schlaufe und Kompression der LAD. Die Thoraxnaht wurde mit einem monofilen 4-0 Faden (Prolene™, Johnson & Johnson Ethicon, Norderstedt, Deutschland) durchgeführt. Die Enden der Fadenschlinge durch den Polyethylenring verblieben hiernach beidseits seitlich der Thoraxnaht, wurden verknotet und subcutan rechts verortet. Die Hautnaht wurde mit einem monofilen 5-0 Faden (Prolene™, Johnson & Johnson Ethicon, Norderstedt, Deutschland) durchgeführt. Die Extubation wurde nach dem Erwachen der Maus vollzogen. Die postoperative Analgesie wurde mittels Buprenorphin (0,05-1 mg/kg) für 48 Stunden dreimal täglich subcutan gesichert.

2.1.2.2. Induktion der Ischämie bei geschlossenem Thorax

Unter inhalativer Analgosedierung erfolgte, ohne Re-Thorakotomie, die Okklusion der LAD. Hierzu wurde die Maus zunächst mithilfe von 5 Vol.-% Isofluran (Fluovac, Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland) bei einem FiO_2 von 33 % via Maske sediert. Zum Schutz des Personals bei nicht geschlossenem System via Maske erfolgte eine Absaugung des volatilen Anästhetikums mithilfe des Veterinary Fluosorber (Fluovac Harvard Apparatur, Edenbridge, Kent, UK).

Die Okklusion vollzog sich wieder in Rückenlage, auf einer Wärmeplatte mit Fixierung der Pfoten mittels Tape und einer, über eine rektale Sonde gemessenen, Körperkerntemperatur von 37 bis 37,5 °C. Eine elektrokardiographische Kontrolle (Hugo Sachs Harvard-Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland), mit Befestigung der Elektroden an den Füßen der Maus, ermöglichte die Erfolgskontrolle der Ischämieinduktion. Die Aufzeichnung wurde über die Basic Data Acquisition Software (BDAS; Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA) vollzogen. Ein EKG wurde vor der Präparation angefertigt.

Die Konzentration des volatilen Anästhetikums wurde zur Narkoseerhaltung auf 2 Vol.-% reduziert, um folgend die Hautnähte zu eröffnen. Nun wurden die Ligaturfäden spannungsfrei freipräpariert, der Knoten gelöst und die Fäden zu beiden lateralen Körperseiten der Maus horizontal geführt und an einem Magnethalter mit Klebeband befestigt. Durch Bewegung der Magnethalter wurde nun die Fadenspannung unter EKG-Kontrolle so lange erhöht, bis eine ST-Strecken-Hebung zu verzeichnen war. Diese Spannung wurde nun über 60 Minuten aufrecht gehalten und kontinuierlich kontrolliert. Die Wunde wurde durch Aufbringen isotoner 0,9 %-iger Kochsalzlösung (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland) feucht gehalten und mit Betaisodona® Lösung (Mundipharma GmbH, Limburg, Deutschland) desinfiziert. Nach 60 Minuten erfolgte eine Durchtrennung der Okklusionsfäden, möglichst Thorax nah, mit anschließend erneuter Hautnaht mit monofilem 5-0 Faden (Prolene™, Johnson & Johnson Ethicon, Norderstedt, Deutschland). Die Reperfusion wurde im EKG mit leichter Absenkung der ST-Strecken-Hebung dokumentiert und kontrolliert.

Die Mäuse der Non-Ischämie-Gruppe wurden für 60 Minuten, entsprechend der Okklusionszeit der Ischämie-Gruppe, mit Isofluran narkotisiert.

2.1.3. Verwendetes Areal

Durch die Intention in dieser Dissertation, das Verhalten des *remote* Myokards nach Ischämie und Reperfusion darzustellen, musste ein Bereich des Myokards gewählt werden, welcher sicher zum nicht ischämischen Bereich gehört. Diversen Veröffentlichungen am Maus-Modell, aber auch anderen Tieren und in humanen Untersuchungen, in vitro und in vivo, gelang es mit bildgebenden und histopathologischen Verfahren, den Ischämiebereich nach Okklusion der LAD im Ischämie-Reperfusion Modell darzustellen. In Kapitel 1.7.1.3. wurde diese Methode ausführlich erläutert. Es wurde auf Basis dieser Veröffentlichung sowie weiterer Ergebnisse der Forschungsgruppe des Institutes für Pharmakologie davon ausgegangen, dass der Musculus papillaris posterior im Normalfall nicht im Versorgungs- und somit Ischämiegebiet der LAD liegt.

2.1.4. Tyrode-Lösung

Die Tyrode-Lösung ist nach dem amerikanischen Pharmakologen Maurice Vejux Tyrode benannt und stellt eine physiologische Lösung hinsichtlich der Elektrolytkonzentrationen, äquivalent zum Blut, für Gewebe- und Zellkulturen dar.

Es existieren diverse Herstellungsprotokolle zu dieser Lösung. Getestet wurde zunächst das Würzburger-Protokoll aus der Pharmakologie der Universität Würzburg, zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. med. J. Schmitt.

Würzburger-Protokoll

MENGE	SUBSTANZ
4400 ML	Reinstwasser (Milli-Q®)
9 G	Glucose (D+ wasserfrei)
250 MG	Ascorbinsäure (Vitamin C)
1100 MG	Natriumpyruvat

Tabelle 1: Zusammensetzung der Tyrode-Lösung (Pharmakologie der Universität Würzburg)

Folgend wurden je 200 ml auf drei Aufbewahrungsbehälter verteilt und mit Stock I, II und III markiert.

Stock I

MENGE	SUBSTANZ
1000 ml	Reinstwasser (Milli-Q®)
175 g	Natriumchlorid (NaCl)
10 g	Kaliumchlorid (KCl)
5,08 g	Magnesiumchlorid wasserfrei (MgCl ₂)

Tabelle 2: Zusammensetzung des aus der Tyrode-Lösung (Tabelle 1) hergestellten Stock I

Stock II

MENGE	SUBSTANZ
1000 ml	Reinstwasser (Milli-Q®)
47,47 g	Natriumchlorid (NaCl)

Tabelle 3: Zusammensetzung des aus der Tyrode-Lösung (Tabelle 1) hergestellten Stock II

Stock III

MENGE	SUBSTANZ
1000 ml	Reinstwasser (Milli-Q®)
1,45 g	Natriumhydrogenphosphat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \bullet \text{H}_2\text{O}$)

Tabelle 4: Zusammensetzung des aus Tyrode-Lösung (Tabelle 1) hergestellten Stock III

Durch Säure-/Base-Titration wurde ein physiologischer pH-Wert von 7,4 eingestellt. Danach wurde aus einem weiteren Stock einer 1M Calciumchlorid-Lösung (1,47 g auf 10ml) dem Stock I-III jeweils 6ml (1,2mM) $\text{CaCl}_2 \bullet 2 \text{H}_2\text{O}$ hinzugefügt.

Trotz mehrfacher Prüfung aller Materialien sowie der Herstellung konnte keine stabile funktionelle Lösung hergestellt werden. Zielführend war schließlich ein Protokoll einer Forschungsgruppe der klinischen Kardiologie der HHU.

Kardiologie – Protokoll

MENGE	SUBSTANZ
2000 ml	Reinstwasser (Milli-Q®)
13,8 g	Natriumchlorid (NaCl)
0,7 g	Kaliumchlorid (KCl)
0,4 g	Magnesiumsulfat ($\text{MgSO}_4 \bullet 7 \text{H}_2\text{O}$)
4,18 g	Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)
0,32 g	Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)
3,6 g	Glucose D+ wasserfrei

Tabelle 5: Zusammensetzung der Tyrode-Lösung aus dem Forschungslabor der klinischen Kardiologie der HHU Düsseldorf

Diese Lösung besaß einen pH-Wert von 7,8 und musste daher, um einen physiologischen pH-Wert zu erreichen, für 20 Minuten mit Carbogen begast werden. Carbogen ist ein Gasgemisch aus 5 Volumenanteilen Kohlenstoffdioxid und 95 Volumenanteilen Sauerstoff. Danach wurden 0,74 g Calciumchlorid (CaCl_2) hinzugefügt und der pH-Wert erneut geprüft. Dieser lag konstant bei 7,4. Es gab keine pH-Wert-Schwankungen.

Mit dieser Lösung konnten stabile Ergebnisse erzielt werden.

2.1.5. Organbad und Messinstrumente

Zur experimentellen Durchführung am Papillarmuskel (*Musculus papillaris posterior*) wurden ein Organbad (Panlab ML0126/10, ADInstruments GmbH, Sprechbach, Deutschland) inklusive Stimulator (2 Channel Stimulator, LE12206, ADInstruments GmbH) und ein PC mit Analyse-Software (LabChart, ADInstruments GmbH, Sprechbach, Deutschland) benutzt. Das Organbad wurde in der Basiskonfiguration zur experimentellen Arbeit mit etwa 500 ml der Tyrode-Lösung nach dem Kardiologie-Protokoll gespült und minimaler Carbogen Zulauf gewährt (Abbildung 18).

2.1.6. Probenentnahme und Präparation

Eine Standard-Petrischale (10 cm Durchmesser) wurde mit der Tyrode-Lösung bodenbedeckt gefüllt, auf Eis gestellt und die Lösung auf etwa 4 °C heruntergekühlt.

Die Petrischale mit Silikonboden (TFC Silikon Kautschuk Typ 1) wurde ebenfalls mit Tyrode-Lösung bodenbedeckt gefüllt. Es wurden zwei Fäden (DanVile's 70 Denier 200 yds, FlyMaster 6/0 waxed, Düsseldorf, Deutschland) vorgelegt. Der erste Faden, zur Befestigung am kaudalen Ende des Papillarmuskels wurde vorbereitet. Es wurde eine feste Schlinge am kaudalen Ende und, etwa 5-10 mm entfernt, eine reine Fadenschlaufe gebildet und in die Petrischale gelegt. Der zweite Faden, zur Befestigung an den Sehnenfäden des Papillarmuskels, wird nur mit einer Fadenschlinge versehen.



Abb. 19: Fadenschlingen in einer Petrischale mit Silikonboden

Oben links der Faden für das kraniale Ende des Papillarmuskels zur Befestigung an den Sehnenfäden. Darunter der Faden für das kaudale Ende des Papillarmuskels mit zwei Fadenschlingen. Eine justierbare Fadenschlinge für den basalen Teil des Papillarmuskels und eine feste Schlinge zur Befestigung am Haltapparat des Organbades.

Die Tötung der Mäuse erfolgte 24 Stunden nach Induktion, durch zervikale Dislokation nach Maßgabe des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) und im Rahmen des Tierschutzgesetzes. Es wurden zur Präparation mikrochirurgische Instrumente verwendet. Folgend wurde der Thorax mittels Querinzision entlang der letzten Rippen und diagonaler Durchtrennung der Rippen in Richtung der Schultern beidseits eröffnet und das Herz im Ganzen durch kraniales Absetzen am Aortenbogen herausgelöst. Der ischämische, makroskopisch sichtbar abgeblasste Anteil des Myokards war nach Eröffnung des Thorax jederzeit klar erkennbar. Anschließend wurde das Herz in die mit Tyrode-Lösung gefüllte Standard-Petrischale überführt, wo es weiter schlug und das noch im Herz verbliebene Blut auspumpte. Verhindert wurde so die Thrombosierung des Blutes in den Ventrikeln, welche bei Ablösung durch Zug an den Muskelfasern zur Verfälschung der Ergebnisse hätte führen könnte. Das Herz wurde in die Petrischale mit Silikonboden und 4 °C kalter Tyrode-Lösung überführt und mit der Herzspitze nach oben gelagert. Zur Hilfe wurden die Vorhöfe mit einer Nadel befestigt. Folgend wurden die Vorhöfe mit einer Präzisionsschere abgetrennt. Im 90 Grad Winkel

zum interventrikulären Septum von Seiten des rechten Ventrikels wurde dieser bis zur Herzspitze eröffnet. In sämtlichen Präparationsschritten war die Ausübung von Zug auf das Myokard unbedingt zu vermeiden. Die aufgeklappten Wände des rechten Ventrikels wurden mittels Stecknadeln vorsichtig am Boden der Petrischale befestigt. Folgend wurde mit Durchtrennung des interventrikulären Septums der linke Ventrikel eröffnet und auch die aufgeklappten Wände des linken Ventrikels am Boden der Petrischale mittels Stecknadeln fixiert.



Abb. 20: Mäuseherz mit sichtbarer hämorrhagischer Ischämiezone an der Herzbasis

Anschließend erfolgte die Präparation des hinteren Papillarmuskels (Musculus papillaris posterior) unter dem Mikroskop mit weit kranialer Ablösung der Sehnenfäden an der Mitralklappe.



Abb. 21: Präparierter Papillarmuskel

Ansicht eines präparierten Papillarmuskels mit dorsal befindlichem Myokard des linken Ventrikels. Fixiert wurde der Papillarmuskel mit zwei Stecknadeln zur Fotografie. Es handelt sich um einen Papillarmuskel der nicht in die Auswertung einbezogen wurde.

Der Papillarmuskel befand sich, in Position des Herzens mit der Herzspitze nach kranial, rechts der Eröffnungslinie. Kaudal wurde der Papillarmuskel mit etwas Myokard des linken Ventrikels abgelöst. Die vorgelegte Fadenschlinge ohne feste Schlinge wurde nun an den Sehnenfäden zugezogen. Die zweite Fadenschlinge mit fester Schlinge wurde möglichst basal am Papillarmuskel angeschlungen. Die überflüssigen Fadenenden wurden abgeschnitten.

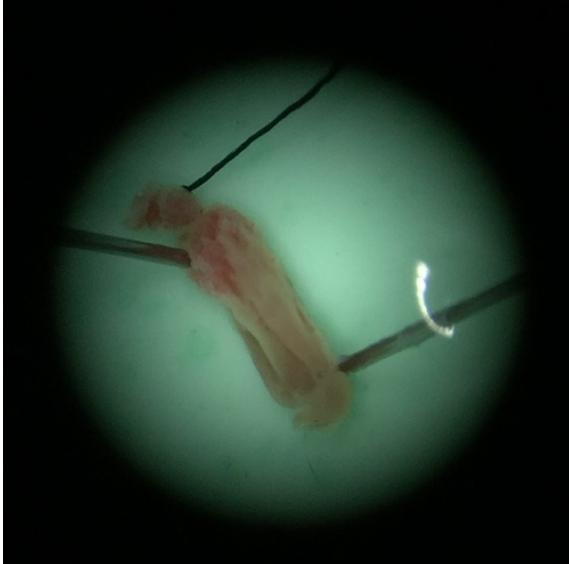


Abb. 22: Teilpräparierter Papillarmuskel mit Ischämie an der Basis

Darstellung der Teilpräparation eines Papillarmuskels, der zur Fotografie mit Stecknadeln befestigt wurde. Am oberen Ende wurde eine Fadenschlinge übungsweise befestigt. Die Basis des Papillarmuskels erscheint abgeblasst und ist damit von der Ischämie betroffen. Dieser Papillarmuskel wurde nicht verwendet.

Danach konnte das Einspannen des Papillarmuskels in das Organbad und an den Kraftaufnehmer erfolgen. Dazu wurden der Kraftaufnehmer und die Elektrodenhalterung kurz in die Tyrode-Lösung eingetaucht und beseitigt, falls vorhanden, den Tyrodefilm im Elektrodenring. Der Kraftaufnehmer und die Elektrodenhalterung wurden so weit hochgeschraubt, dass sie über dem Organbad außerhalb der Lösung lagen. Zunächst wurden beide Fäden mit dem Papillarmuskel, mit einer nicht magnetischen Pinzette, von oben durch beide Elektrodenringe geführt. Der kaudale Faden an der Basis des Papillarmuskels wurde nun mit der festen Schlinge am unteren Haken der Elektrodenhalterung befestigt. Der kraniale Faden an den Sehnenfäden wurde anschließend vorsichtig und ohne Zug an den Kraftaufnehmer durch Flüssigkeitsadhäsion geklebt und mit einem winzigen Tropfen Histoacryl Kleber sicher befestigt. Der Papillarmuskel und beide Fäden mussten frei hängen und durften nicht adhären an der Wand sein. Der gesamte Halteapparat wurde nun in das

Reagenzglas des Organbades abgesenkt. Eine mögliche Adhäsion des Fadens oder Papillarmuskels wurde erneut geprüft. Der Kraftaufnehmer und die Elektrodenhalterung wurden nun vorsichtig vorgespannt, bis in der Analyse-Software ein sauberes stabiles Signal ableitbar war und die Sarkomere eine Ruhestellung erreicht hatten. Gegebenenfalls musste das Organbad gespült werden, um neue frische Tyrode-Lösung in das Reagenzglas zuzuführen. Nun erfolgte der Nullabgleich an der Analyse-Software.

2.2. Analyse des *remote* Myokards

Im Folgenden wurden im Organbad diverse Messungen hinsichtlich der Inotropie des *remote* Myokards durch verschiedene Stressoren, angelehnt an die physiologische Belastung, vorgenommen.

2.2.1. Frequenzanalyse

Dieser Versuchsaufbau wurde mit einer separaten Kohorte an Versuchstieren mit Ischämie/Reperfusion (I/R) (n = 14) und Voroperation (n = 13) durchgeführt. In diesem Versuchsaufbau wurden, mit einer festen Vorspannung von 1 mN und steigenden Stimulationsfrequenzen, die Veränderung der Amplitude und somit Inotropie und Chronotropie des *remote* Myokards untersucht. Zudem wurden die Geschwindigkeiten des Kraftanstiegs und -abfalls erfasst. Äquivalent ist dies den steigenden Herzfrequenzen bei Ausübung von Sport nach einem Myokardinfarkt zuzuordnen.

Am Kraftaufnehmer wurde die Spannung so weit erhöht, bis eine Vorspannung von 1 mN erreicht und stabil gehalten wurde. Zum Teil musste die Vorspannung im Verlauf erneut angepasst und auf 1 mN eingestellt werden. Die Feldstärke am Elektrostimulator wurde auf 50 mA festgelegt. Die Stimulationsdauer wurde auf 10 ms festgelegt. Die Frequenzen wurden dann sukzessive mit einem Delta von 1 Hz in einem Bereich zwischen 1 und 12 Hz gesteigert und pro Stimulationsfrequenz 30 Sekunden aufgezeichnet.

2.2.2. Kraftanalyse mittels Isoproterenol

Die folgenden Versuchsprotokolle wurden mit der zweiten Kohorte an Versuchstieren mit $n = 11$ für die I/R-Gruppe und $n = 12$ für die Sham-Gruppe durchgeführt. Diese Analyse dient ebenfalls der Einschätzung der Inotropie des *remote* Myokards bei steigenden Konzentrationen von Katecholaminen. Isoproterenol ist ein unselektiver beta-Adrenozeptor-Agonist. Es bindet somit an β_1 - wie auch β_2 -Rezeptoren und beeinflusst so die adrenergen Signalkaskaden. Wie in Kapitel 1.6.6. bereits dargestellt sind die beta-adrenergen Rezeptoren maßgeblich an der Funktion, hinsichtlich Inotropie, Chronotropie, Lusitropie und Dromotropie, des Herzens beteiligt. Zur Beurteilung dieser Parameter des *remote* Myokards bedient sich diese Arbeit diesem Ansatz. Ebenso werden Ergebnisse zur Beurteilung der kontraktilen Reserve erwartet. Physiologisch sezerniert das Nebennierenmark, auch in Phasen z. B. von Stress, ebenfalls vermehrt Adrenalin, was hier simuliert wird. Durch die Rekonvaleszenz-Zeit von 72 Stunden sollten sich die endogenen Katecholaminlevel nach Ischämieinduktion wieder im Normbereich befinden.

Zum Versuchsaufbau wurden verschiedene molare Lösungen von Isoproterenol hergestellt. Die einzelnen verwendeten Konzentrationen waren wie folgt:

1 nM

3 nM

10 nM

30 nM

100 nM

300 nM

1000 nM

Vor der Zufuhr von Isoproterenol erfolgte eine 10-minütige Kalibrierungsphase des eingespannten Papillarmuskels. Konstant wurden eine Frequenz von 60 bpm und eine Vorspannung von 1 mN beibehalten. Danach wurden, dem Reagenzglas im Organbad mit dem darin befindlichen Papillarmuskel, jeweils 10 μ l jeder der oben genannten

molaren Lösungen zugeführt. Danach folgte erneut eine kurze Kalibrierungsphase von 3 Minuten, ehe die Messung über 10 Amplituden erfolgte. Das Organbad wurde dreimal gespült, um die vorherige Konzentration des Isoproterenol vollständig auszuwaschen. Es folgten erneut 3 Minuten Kalibrierung, ehe die nächste Konzentration hinzugefügt wurde. Dieser Ablauf wiederholt sich bis zum Erreichen der Konzentrationsmenge von 1000 nM. Zum Abschluss des Versuches erfolgte eine Spülung des Reagenzglases mit 100ml der Tyrode-Lösung.

2.2.3. Kraftanalyse mittels Vorspannung der Papillarmuskeln

Das Protokoll schloss unmittelbar an Kapitel 2.2.2. an und untersuchte ebenfalls die Funktion des *remote* Myokards hinsichtlich kontraktile Amplitude und Reserve sowie der Kraftanstiegs- und Kraftabfallgeschwindigkeiten. Dies wurde mithilfe einer feststehenden Stimulationsfrequenz von 1 Hz und steigenden Vorspannungen und somit auseinander weichenden Sarkomeren untersucht. Es diente der Simulation einer Druck- oder Volumenbelastung des linken Ventrikels und des *remote* Myokards nach myokardialer Ischämie. Die Korrelation zwischen linksventrikulärer Füllung und der Auswurfleistung des linken Herzens (Ejektionsfraktion) wird im Frank-Starling-Mechanismus beschrieben (Kapitel 1.6.1.). Je höher das enddiastolische Füllungsvolumen und damit die Vorlast ist, desto höher ist auch das systolische Schlagvolumen und daran orientiert prozentual die EF. Das Auseinanderweichen der Sarkomere bei erhöhter Vorlast und Volumenbelastung steigert die Kontraktionskraft der Myozyten. Das Druck-Volumen-Diagramm wird nach rechts verschoben. Diese Situation kann für die Kraftmessungen am Papillarmuskel im Organbad durch eine Erhöhung der Vorspannung simuliert werden.

Am Elektrostimulator wurde als Basis eine durchgehende Stimulationsfrequenz von 1 Hz eingestellt und mit einer Frequenz von 60 bpm und mit einer Vorspannung von 1 mN begonnen. Diese Vorspannung wurde dann allmählich in den folgenden Schritten gesteigert und für 30 Sekunden aufgezeichnet.

1 mN

2 mN

3 mN

5 mN

7 mN

10 mN

15 mN

20 mN

25 mN

Im Verlauf des Versuchs wurde der Versuchsaufbau abgewandelt und die Messung an 10 Amplituden unabhängig von der Zeit durchgeführt, da vor allem in den höheren Vorspannungsbereichen eine stabile Vorspannung über 30 Sekunden nicht gehalten werden konnte und der Versuch oft vorzeitig abgebrochen werden musste. Allerdings ließ sich eine Vorspannung über 5 mN kaum realisieren, da der Papillarmuskel bereits bei einer Vorspannung von 7 mN fast regelhaft abbriss oder keine stabile Vorspannung mehr erreicht werden konnte.

2.2.4. Abbruchkriterien

Die Protokolle wurden jeweils unter den folgenden Konstellationen beendet. Entweder durch Abriss bzw. Dekonstruktion des Gewebes im Organbad, Verfehlung und fehlender Korrigierbarkeit der Standardparameter oder vollständiger Durchführung des Versuchsprotokolls.

2.2.5. Normierung

2.2.5.1. Papillarmuskel – Gewichte

Es erfolgten zwei Ansätze zur Normierung der Messdaten auf das Gewicht der Papillarmuskeln. Im Protokoll der steigenden Stimulationsfrequenzen (Kapitel 2.2.1) wurde das Gewicht unmittelbar nach der Messung und Lösung der Fäden im Nasszustand auf einer Feinwaage bestimmt.

In den folgenden Protokollen ab Kapitel 2.2.2 erfolgte unmittelbar nach der Messung und Lösung der Bindfäden an den Sehnenfäden und dem Wandmyokard eine Lufttrocknung für 1 Stunde bei Zimmertemperatur. Im Anschluss wurde das Gewicht auf einer Feinwaage bestimmt. Die Ergebnisse wurden in beiden Ansätzen in Relation zu den Messdaten gesetzt.

2.2.5.2. Querdurchmesser der Papillarmuskeln

Die getrockneten Papillarmuskeln wurden in Paraffin eingelegt und danach am Mikrotom Feinschnitte mit einer Präparatdicke von 8 µm alle 200 µm angefertigt und auf einem Objektträger fixiert. Ziel war es, sie anschließend zu mikroskopieren und hochauflösende Aufnahmen mit einem Objektiv (20-fache Vergrößerung) anzufertigen. Die Aufnahmen sollten auf den reinen Papillarmuskel ohne Sehnenansätze oder Myokard zugeschnitten, mit der Software ImageJ[®] ausgemessen und die Mittelwerte bestimmt werden. Ziel war auch hier eine Normalisierung auf die Querdurchmesser.

2.2.6. Datenanalyse-Software Labchart©

LabChart© ist eine Datenakquisitions und –analyse Software für physiologische Daten der Firma ADInstruments GmbH aus Sprechbach in Deutschland. Die Daten des Messabnehmers aus dem Organbad wurden in die Chart-Software LabChart© übertragen. Zunächst erfolgte ein Nullabgleich. Die Einstellung der y-Achse wurde in

jeder Kurvenableitung so gewählt, dass der höchste Punkt circa 50 % der Gesamthöhe zu Beginn einnimmt. Der Filter für Artefakte wurde auf eine Empfindlichkeit von 50 Hz eingestellt. Individuell wurde in den Auswertungen vereinzelt dieser cut-off zur Reduktion von Artefakten angepasst. Ebenso wurde der Filter gegen hochfrequente Störungen implementiert. Eine weitere Justierung konnte über „bridge amplifier“ erfolgen. Hier wurden Frequenzen von < 10 Hz, teilweise 15 Hz, gewählt, die damit unterdrückt wurden. Es folgte dann die Kalibrierung des Kraftaufnehmers. Dazu wurde eine Aufzeichnung der Ausschläge des Kraftaufnehmers, ohne ein daran befestigtes Gewicht und anschließend mit einem definierten Gewicht von 5 mg, angefertigt. Diese wurden durch Markierung der Bereiche und Konversion der Einheiten in Beziehung zueinander gesetzt und als Punkte in Bezug zum Gewicht genau definiert. LabChart© konnte somit bei unterschiedlichen Papillargewichten die Kurven und Messwerte adaptieren. Es wurden insgesamt vier Kanäle aufgezeichnet und dargestellt. Chanel 1 für die Kraftamplitude zur Bestimmung der kontraktiven Kraftentwicklung in mN. Errechnet wurde dieses über den höchsten Punkt der Kurve abzüglich des niedrigsten Punktes. Es wurden 10 Amplituden erfasst und über diese der Mittelwert errechnet. Chanel 2 stellte die elektrische Spannung in Mikrovolt dar. Diese entspricht der Feldstärke über den elektrischen Stimulator von 50 mA, entsprechend in Mikrovolt umgerechnet. Chanel 3 zeichnete die Kraftanstiegs- und Kraftabfallgeschwindigkeit in Millinewton pro Sekunde auf. Diese errechnet sich über die Amplitude im Verhältnis zu der Zeit, beginnend vom niedrigsten Punkt der Kurve zu Beginn der Kontraktion bis zum höchsten Punkt. Die Abfallgeschwindigkeit entsprechend umgekehrt. Chanel 4 wies die Stimulationsfrequenz (beats per minute, bpm) aus. Diese war in den meisten Versuchsprotokollen auf 60 bpm festgelegt und wurde lediglich im Versuchsaufbau unter Kapitel 2.2.1. zur Frequenzanalyse alteriert.



Abb. 23: Exemplarische Aufzeichnung mittels LabChart©

Dargestellt sind die Kraftentwicklung (obere Kurve) und die Geschwindigkeit der Kraftänderung (untere Kurve) über die Zeit bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz.

2.2.7. Standardbedingungen

Die Standardbedingungen der einzelnen Protokolle wurden wie folgt festgelegt. Für die Frequenzanalyse sowie für die Kraftanalyse mittels Isoproterenol wurde eine konstante Vorspannung von 1 mN gehalten. Die Standardstimulationsfrequenz betrug für die Kraftanalysen mittels Isoproterenol und Vorspannung 1 Hz, wodurch eine durchgehende Kontraktionsfrequenz von 60 bpm erreicht werden konnte.

2.2.8. Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mittels der Software GraphPad Prism 10.1.2. (GraphPad Software, Inc., La Jolla–San Diego, CA, USA). Alle Daten werden mit Mittelwerten \pm Standardfehler (SEM) angegeben beziehungsweise dargestellt. Für die Vergleiche beider Gruppen wurde ein ungepaarter T-Test verwendet.

3. Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse im Vergleich der beiden Gruppen 24 Stunden nach I/R und Kontrollgruppe (Sham) hinsichtlich maximaler Kraftgenerierung und der Kraftanstiegs- und Kraftabfallgeschwindigkeit unter elektrischer Stimulation, Stimulation mit Isoproterenol sowie Variation der Vorspannung dargestellt. Verwendet wurde der im linken Ventrikel befindliche posteriore Papillarmuskel als Teil des *remote* Myokards.

3.1. Stimulation und physikalische Größen

An der ersten Kohorte mit 14 Versuchstieren der I/R-Gruppe (n = 14) und 13 Versuchstieren der Sham-Gruppe (n = 13) wurden, nach oben genanntem Protokoll, die elektrischen Stimulationsfrequenzen variiert und folgend Amplitude, Kraftanstiegs- und Kraftabfallgeschwindigkeiten gemessen. An den präparierten Papillarmuskeln der Sham- und I/R-Gruppe wurden zunächst die basalen Werte der zu ermittelnden Kenngrößen zu standardisierten Messbedingungen ermittelt. Danach erfolgt die Variation der Stimulationsfrequenzen.

An der zweiten Kohorte mit 12 Versuchstieren der I/R-Gruppe (n = 12) und 11 Versuchstieren der Sham-Gruppe (n = 11), wurden, nach den oben genannten Protokollen, zur Stimulation mit diversen Isoproterenol-Konzentrationen und variablen Vorspannungen erneut die Amplitude sowie Kraftanstiegs- und Kraftabfallgeschwindigkeiten ermittelt. Nach zuvor genanntem Protokoll wurden die präparierten Papillarmuskeln der Sham- und I/R Gruppe zunächst basal gemessen und folgend mit Isoproterenol in steigenden Konzentrationen im Organbad stimuliert. Für beide Kohorten wurden mithilfe der PC-Software LabChart© als Parameter die Amplitude sowie die Kraftanstiegs- und Kraftabfallgeschwindigkeit erfasst und ausgewertet. Die Amplitude wurde hier als dynamische Kraftmessung mit der Einheit Newton bzw. Millinewton gemessen. Physikalisch handelt es sich um die Beschleunigung ($a = m/s^2$) eines Körpers mit definierter Masse (m). Die Formel hierzu lautet $F = m \cdot a$. Gemessen wurde von der maximalen Relaxation (Minimum) bis zur maximalen

Kontraktion (Maximum) [76]. Die Kraftanstiegsgeschwindigkeit bezieht sich auf die Kraftmenge, die der Muskel über die Zeit erzeugen kann. Die Kraftabfallgeschwindigkeit definiert dementsprechend den Kraftverlust über die Zeit.

3.2. Amplituden

Zunächst werden die Entwicklungen der Amplituden beider Gruppen unter verschiedenen Aspekten und Bedingungen dargestellt. Wie bereits erwähnt, handelt es sich im Folgenden um zwei verschiedene Versuchsgruppen. Für die Frequenzversuche wurden I/R n = 14 und Sham n = 13 verwendet. Für die Protokolle der beta-adrenergen Stimulation und der Vorspannung kamen für I/R 9 Versuchstiere in die Auswertung und für Sham ebenfalls. Nach zuvor genannter Methodik wurde die kontraktile Amplitude unter steigenden Frequenzen, variabler Isoproterenol-Konzentration und variierenden Vorspannungen untersucht. Die Ergebnisse werden im Folgenden dargestellt.

3.2.1. Amplituden nach elektrischer Stimulation

Untersucht wurde die Reaktion des *remote* Myokards am posterioren Papillarmuskel mittels elektrischer Stimulation bei steigenden Frequenzen. Erwartbar war, bei höheren Frequenzen eine geringere Kontraktionskraft und damit verminderte Amplitude, etwa aufgrund einer unvollständigen Relaxation und/oder eines erhöhten Energiebedarfs der Muskeln. Es ist bekannt, dass die Kontraktionskraft eines Muskels proportional zu dessen Querschnitt steigt. Es wurde ein höherer Querschnitt bei höherem Gewicht postuliert.

Ersichtlich sind an Abbildung 24 in beiden Versuchsgruppen insgesamt fallende Amplituden unter steigenden Frequenzen. Die Werte der beiden Gruppen zueinander sind nahezu identisch. Eine Signifikanz bei einem 95 % - Konfidenzintervall ergibt sich zu keiner Bedingung.

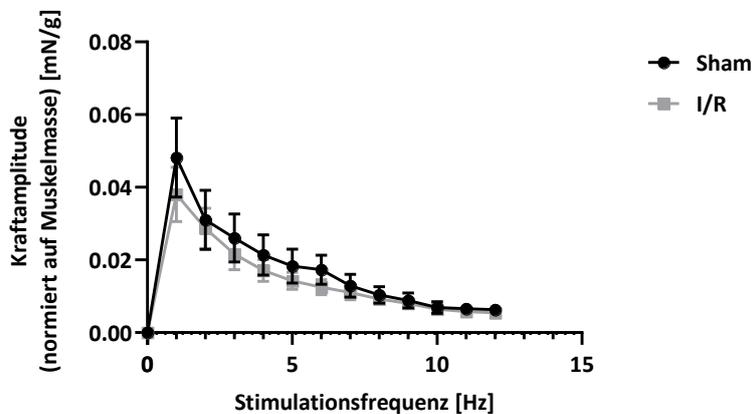


Abb. 24: Graphische Darstellung der Veränderungen der Kraftamplitude unter steigenden Stimulationsfrequenzen normiert auf die Muskelmasse

Das Liniendiagramm stellt für jede Stimulationsfrequenz die Differenz der jeweiligen Amplitudenhöhe zum Ausgangswert, dividiert durch die Muskelmasse bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz \pm SEM dar. Gemessen wurden die Papillarmuskeln von n = 14 der I/R Gruppe und n = 13 der Sham-Gruppe unter steigenden Stimulationsfrequenzen (1 – 12 Hz). Messzeitpunkt war 24 Stunden nach I/R bzw. Sham-Induktion bei konstanter Vorspannung des Muskels mit 1 mN.

Die Abnahme der Amplitude, mit schrittweise um ein Hertz steigenden Stimulationsfrequenzen, ist im niedrigen Frequenzbereich am höchsten und sinkt im weiteren Verlauf kontinuierlich. Die Papillarmuskelgewichte lagen im Mittel in der I/R-Gruppe bei $3,67 \pm 1,2$ mg und in der Sham-Gruppe bei $3,07 \pm 1,42$ mg. Insgesamt sind, insbesondere bis zu einer Stimulationsfrequenz von 7 Hz, die Amplituden der I/R-Gruppe in der Tendenz etwas niedriger als in der Kontrollgruppe. Unter den höheren Frequenzen ab 8 Hz ist kein relevanter Unterschied beider Gruppen eruiert. Ersichtlich ist, vor allem in den höheren Frequenzbereichen, eine wesentlich geringere Standardabweichung unter Normierung der Werte. Ein Trend hinsichtlich einer geringeren Amplitude in der Gruppe nach I/R ist vorhanden. Signifikante Unterschiede in der Kraftamplitude des *remote* Myokards konnten nicht eruiert werden.

3.2.2. Amplituden unter beta-adrenerger-Stimulation

Beta-adrenerge Sympathomimetika wie Isoproterenol bewirken eine positive Inotropie am Myokard. Diese muskuläre Kraftentwicklung des *remote* Myokards stellt die Amplitude dar. Gemessen wurde der Effekt steigender Isoproterenol-Konzentrationen zwischen 1 und 1000 nM auf den Papillarmuskel. Die Berechnung erfolgte über 10 gemittelte Amplituden je Papillarmuskel. Die ermittelten Werte finden sich in Abbildung 25 als Differenzwerte zum Ausgangswert der I/R- und Sham-Gruppe. Aus der Ischämie-Reperfusionsgruppe wurden drei Papillarmuskeln (n3, n6, n12) nicht in die Auswertung einbezogen. An diesen waren keine Kraftentwicklungen zu verzeichnen. Eine mögliche Erklärung liegt in der erschwerten Präparation. Bei einem Versuchstier lag der Papillarmuskel zweigeteilt vor. Bei den anderen Versuchstieren musste der Papillarmuskel aufwendiger präpariert werden. Eine Beschädigung der muskulären Struktur und damit verbundenen Beeinflussung der Sarkomere ist nicht sicher auszuschließen und wird angenommen. Ebenso wurde aus der Sham-Gruppe n3 aufgrund instabiler Grundfrequenzen nicht in die Auswertung einbezogen. Hier lag ein möglicherweise noch endogen hohes Katecholaminlevel trotz der Rekonvaleszenz-Zeit zugrunde, weshalb es zum Flimmern mit Frequenzen um 120 bpm kam. Somit ist n = 10 für die Sham-Gruppe und n = 9 für die I/R-Gruppe. Des Weiteren wurden Einzelwerte aufgrund nicht zutreffender Standardbedingungen (Kapitel 2.2.7.) der Auswertung entzogen. Dies betraf die Versuchstiere 4 und 11 der I/R Gruppe bei einer Isoproterenol-Konzentration von 1000 nM, da die Kontraktionsfrequenz 1,3- bzw. 6-fach höher als zur Standardbedingung von 60 bpm war. Aus dem gleichen Grund wurde auch der Messwert bei einer Isoproterenol-Konzentration von 300 nM bei Versuchstier 9 eliminiert, da hier die Kontraktionsfrequenz 6-fach höher lag.

Ersichtlich ist unter logarithmisch ansteigender Isoproterenol-Konzentration ein steter Anstieg der Amplitude. In der Sham-Gruppe zeigt sich dieser bis zu einer Konzentration von 300 nM Isoproterenol, in der I/R-Gruppe bis 30 nM. Danach fällt die Kraftentwicklung in beiden Gruppen zunehmend ab. In der Ischämie-Reperfusions-Gruppe im Trend ausgeprägter als in der Kontroll-Gruppe.

Nach makroskopischer Begutachtung und physiologisch interindividuell erwartbar fanden sich Unterschiede in Länge und Breite der Papillarmuskeln. Unter physikalischer Annahme einer Korrelation zwischen einem höheren Gewicht bei größeren Querdurchmessern wurde zur Normalisierung das Trockengewicht der Papillarmuskeln ermittelt. Bekannt ist eine proportionale Entwicklung der Kontraktionskraft zum Querschnitt des Muskels. Daher wurde der Differenzwert zum Ausgangswert durch das Gewicht des Papillarmuskels dividiert. Die folgende Darstellung (Abbildung 25) zeigt die Messwerte mit Normalisierung auf die Muskelmasse der Papillarmuskeln. Der Kurvenverlauf zeigt langsam steigende Kraftamplituden, in der Sham-Gruppe bis zu einer Isoproterenol-Konzentration von 300 nM, in der I/R-Gruppe bis 30 nM. Im Trend lässt sich eine höhere Kraftamplitude für das *remote* Myokard verzeichnen. Die folgende Reduktion der Kraftamplitude fällt in der I/R-Gruppe bei einer Isoproterenol – Konzentration von 300 nM noch unter den Wert bei 1 nM Isoproterenol. Die Sham-Gruppe kann in den Isoproterenol-Konzentrationen von 100 bis 1000 nM die Amplitude bei circa 0,13-0,16 mN halten. Die Amplituden der I/R-Gruppe dagegen fielen von 30 bis 300 nM Isoproterenol-Konzentration ab, ehe sie bei 1000 nM wieder anstiegen.

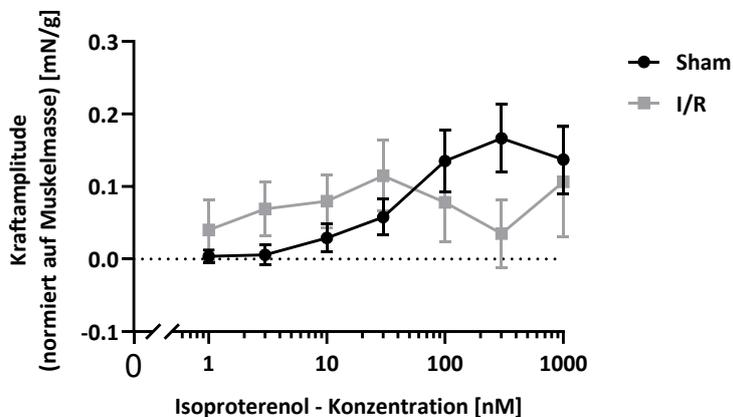


Abb. 25: Graphische Darstellung der Veränderung der Kraftamplitude unter steigenden Isoproterenol-Konzentrationen normiert auf die Muskelmasse

Das Liniendiagramm stellt für jede Isoproterenol-Konzentration die Differenz der jeweiligen Amplitudenhöhe zum Ausgangswert ohne Isoproterenol-Zugabe, dividiert durch die Muskelmasse \pm SEM dar. Gemessen wurden die Papillarmuskeln von $n = 9$ der I/R-Gruppe und $n = 10$ der Sham-Gruppe unter steigenden Isoproterenol-Konzentrationen (1 – 1000 nM). Messzeitpunkt war 24 Stunden nach I/R bzw. Sham-Induktion bei konstanter Vorspannung des Muskels mit 1 mN.

Der eklatanteste Unterschied konnte bei einer Isoproterenol-Konzentration von 300 nM verzeichnet werden (Abbildung 26 und 27).

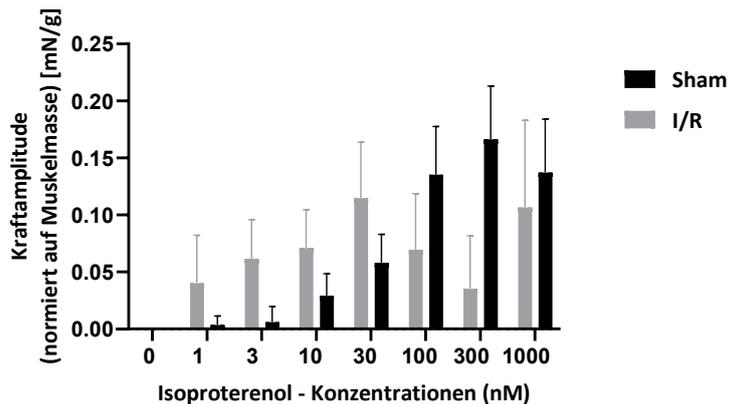


Abb. 26: Graphische Darstellung von Mittelwerten der Differenzwerte zum Ausgangswert der Kraftamplituden unter steigenden Isoproterenol-Konzentrationen normiert auf die Muskelmasse

Das Säulendiagramm stellt für jede Isoproterenol-Konzentration den Mittelwert der jeweiligen Amplitudenhöhe zum Ausgangswert ohne Isoproterenol-Zugabe, dividiert durch die Muskelmasse \pm SEM dar. Gemessen wurden die Papillarmuskeln von $n = 9$ der I/R-Gruppe und $n = 10$ der Sham-Gruppe unter steigenden Isoproterenol-Konzentrationen (1 – 1000 nM). Messzeitpunkt war 24 Stunden nach I/R bzw. Sham-Induktion bei konstanter Vorspannung des Muskels mit 1 mN und einer Frequenz von 60bpm.

Im direkten Vergleich der Mittelwerte beider Gruppen unter einer Konzentration von 300 nM ergeben sich, normiert auf die Muskelmasse, ausgeprägte Unterschiede. Jedoch wird das Signifikanzniveau mit $p = 0,06$ knapp verfehlt. Der Mittelwert für I/R beträgt $0,035 \pm 0,14$ mN/g und für Sham $0,166 \pm 0,13$ mN/g. So ist die Kraftamplitude für das *remote* Myokard um 78 % bei einer Isoproterenol-Konzentration von 300 nM, reduziert. Die Tendenz zu größeren Unterschieden der Kraftamplituden in höheren Konzentrationsbereichen einer beta-adrenergen Stimulation lässt sich erahnen.

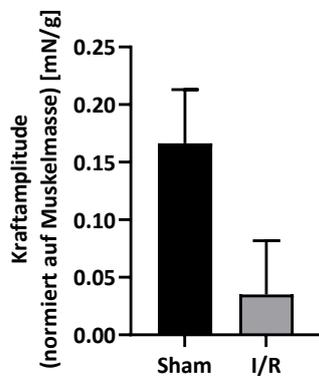


Abb. 27: Graphische Darstellung der Mittelwerte der Kraftamplitude bei einer Isoproterenol-Konzentration von 300 nM

Das Säulendiagramm stellt die Amplitudenhöhen als Differenz zum Ausgangswert, dividiert durch die Muskelmasse bei einer Isoproterenol-Konzentration von 300 nM \pm SEM dar. Gemessen wurden die Papillarmuskeln von n = 9 der I/R Gruppe und n = 10 der voroperierten Sham-Gruppe. Messzeitpunkt war 24 Stunden nach I/R bzw. Sham-Induktion unter einer konstanten Frequenz von 60 bpm.

3.2.3. Amplituden unter Vorspannung

Durch die Variation der Vordehnung des Papillarmuskels werden Ergebnisse hinsichtlich der sich entwickelnden Kraftamplitude erwartet. Dabei werden die Aktin- und Myosin-Filamente der Sarkomere auseinandergezogen. Selbstverständlich ist ohne eine elektronenmikroskopische Darstellung der Zeitpunkt nicht absehbar, in welchem die Dehnung zu groß und eine Überlappung der beiden Filamente nicht mehr gegeben ist. Im Frank-Starling-Mechanismus wird beschrieben, dass die Kontraktionskraft proportional zur Faserlänge des Herzmuskels ist. Überschreiten die Muskelfasern die individuell kritische Länge, fällt die Kontraktionskraft. In dieser Konstellation wäre keine Kraftentwicklung möglich. Bekannt ist jedoch, dass eine häufige moderate Vorspannung zunächst zu einer höheren Kraftentwicklung führt.

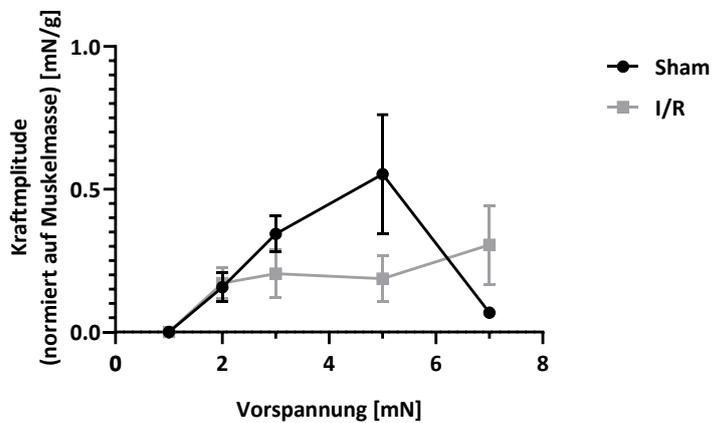


Abb. 28: Graphische Darstellung der Veränderung der Kraftamplitude unter steigender Vorspannung normiert auf die Muskelmasse

Das Liniendiagramm stellt für jede Vorspannung die Differenz der jeweiligen Amplitudenhöhen zum Ausgangswert, dividiert durch die Muskelmasse \pm SEM dar. Gemessen wurden die Papillarmuskeln von $n = 9$ der I/R Gruppe und $n = 10$ der Sham-Gruppe unter steigenden Vorspannungen (1-7 mN). Messzeitpunkt war 24 Stunden nach I/R bzw. Sham-Induktion unter einer konstanten Frequenz von 60 bpm.

Das Diagramm (Abbildung 28) zeigt in beiden Gruppen zunächst erwartungsgemäß einen Anstieg der kontraktiven Amplitude bis zu einer Vorspannung von 3 mN. Die Amplitudenhöhe ist mit einem Mittelwert von $0,55 \pm 0,29$ mN/g, unter einer Vorspannung von 5 mN, in der Sham-Gruppe am höchsten. Es folgt ein Abfall der kontraktiven Amplitude bei 7 mN Vorspannung, basierend jedoch auf $n = 1$, da nur für einen Papillarmuskel diese Vorspannung erreicht werden konnte. Bei I/R liegt der Höchstwert der Kraftamplitude mit $0,30 \pm 0,23$ mN/g bei einer Vorspannung von 7 mN. Im Bereich 7 mN Vorspannung ist $n = 3$ für I/R.

Bei 5 mN Vorspannung ergibt sich ein signifikanter Unterschied in der Differenz der Amplitudenhöhe zum Ausgangswert ($p = 0,0419$) der beiden Gruppen mit einer im Mittel mehr als doppelt so hohen kontraktiven Amplitude der Sham-Gruppe ($0,17 \pm 0,03$ mN) gegenüber der I/R-Kohorte ($0,06 \pm 0,04$ mN) (siehe Abbildung 29). Damit zeigt das *remote* Myokard eine um 61 % reduzierte Kraftamplitude gegenüber non-infarziertem

Myokard. In Normierung auf die Muskelmasse der Papillarmuskeln wird allerdings mit $p=0,104$ keine Signifikanz erreicht.

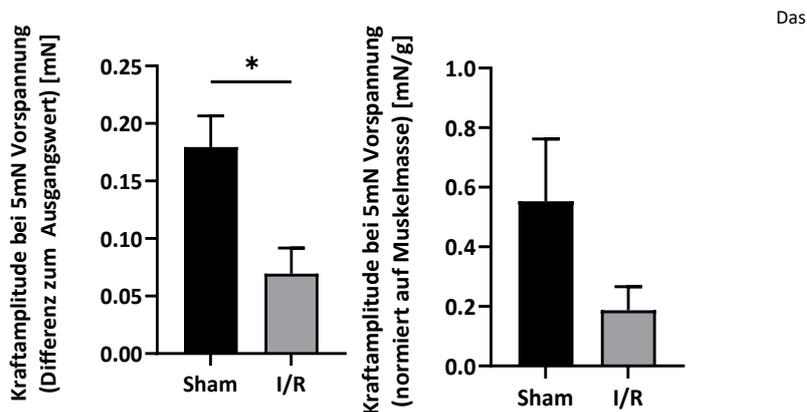


Abb. 29: Graphische Darstellung der Mittelwerte der Kraftamplitude bei einer Vorspannung von 5 mN Säulendiagramm stellt links die Amplitudenhöhen als Differenz zum Ausgangswert und rechts dieselben Werte, dividiert durch die Muskelmasse bei einer Vorspannung von 5 mN \pm SEM dar. Gemessen wurden die Papillarmuskeln von $n = 9$ der I/R Gruppe und $n = 10$ der voroperierten Sham-Gruppe. Messzeitpunkt war 24 Stunden nach I/R bzw. Sham-Induktion unter einer konstanten Frequenz von 60 bpm. * $p < 0,05$, ungepaarter t-Test.

3.3. Geschwindigkeit des Kraftanstiegs

Als Geschwindigkeit des Kraftanstiegs wird die Erhöhung der bei der Kontraktion generierten Kraft pro Zeiteinheit bezeichnet. Im Folgenden werden nun bei gleichem Versuchsaufbau zunächst die Kraftanstiegsgeschwindigkeiten (in mN/s) der ersten Kohorte bei einer Vorspannung von 1 mN unter Frequenzvariationen zwischen 1 und 12 Hz dargestellt.

3.3.1. Geschwindigkeit des Kraftanstiegs unter elektrischer Stimulation

Eine Erhöhung der Herzfrequenz reduziert die Kontraktionskraft. Im Interesse steht auch hier, ob das *remote* Myokard der I/R-Gruppe unter Umständen höhere oder niedrigere Kraftanstiegsgeschwindigkeiten im Vergleich zur Kontrollgruppe aufweist. Bei steigender Stimulationsfrequenz des Herzens sind die Zeiten für Kontraktion und Relaxation des Herzmuskels verkürzt. Je schneller das Herz schlägt, desto weniger Zeit verbleibt für Kontraktion und Relaxation. Die Geschwindigkeiten der Kraftzunahme sind anfangs erhöht. Die Anstiegsgeschwindigkeit nimmt dann jedoch mit zunehmender Frequenz ab und erreicht bei etwa 10 Hz ein Plateau. Dabei liegen insgesamt die Kraftanstiegsgeschwindigkeiten der I/R-Gruppe tendenziell etwas höher als in der Kontrollgruppe.

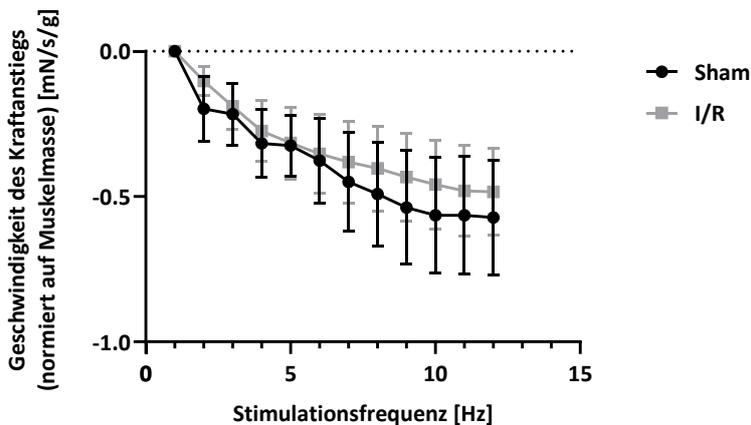


Abb. 30: Graphische Darstellung der Veränderungen der Kraftanstiegsgeschwindigkeiten unter steigenden Stimulationsfrequenzen normiert auf die Muskelmasse

Das Liniendiagramm stellt für jede Stimulationsfrequenz die Differenz der jeweiligen Kraftanstiegsgeschwindigkeit zum Ausgangswert, dividiert durch die Muskelmasse bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz \pm SEM dar. Gemessen wurden die Papillarmuskeln von n = 14 der I/R Gruppe und n = 13 der Sham-Gruppe unter steigenden Stimulationsfrequenzen (1 – 12 Hz). Messzeitpunkt war 24 Stunden nach I/R bzw. Sham-Induktion bei konstanter Vorspannung des Muskels mit 1 mN.

In beiden Gruppen fällt die Kraftanstiegsgeschwindigkeit kontinuierlich, analog zur fallenden Kraftamplitude (vgl. Abbildung 24 und 30), unter den stetig steigenden Stimulationsfrequenzen. Eine signifikante Differenz der Gruppen zueinander lässt sich zu keiner Stimulationsfrequenz eruieren.

3.3.2. Geschwindigkeit des Kraftanstiegs unter beta-adrenerger Stimulation

Unter beta-adrenerger Stimulation mit Isoproterenol erwarten wir entsprechend dem Frank-Starling-Mechanismus neben einer Steigerung der Kontraktionskraft, wie zuvor in den Amplituden dargestellt, denselben Effekt analog für die Kraftanstiegsgeschwindigkeit.

In Abbildung 31 sind die Kraftanstiegsgeschwindigkeiten gemittelt in der Differenz zum Ausgangswert, normiert auf das Gewicht der Papillarmuskelpräparate, dargestellt. Erwartungsgemäß lässt sich eine Zunahme der Geschwindigkeit entsprechend der positiven Inotropie verzeichnen. In der I/R-Gruppe kommt es ab einer Isoproterenol-Konzentration von 30 nM zu einer kontinuierlichen Reduktion der Geschwindigkeit. Absolut sind in der I/R-Gruppe höhere Kraftanstiegsgeschwindigkeiten zu verzeichnen, was auf eine bessere Inotropie hinweisen könnte. In der Sham-Gruppe zeigt sich eine nahezu stetige Zunahme der Kraftanstiegsgeschwindigkeit über alle Isoproterenol-Konzentrationen hinweg.

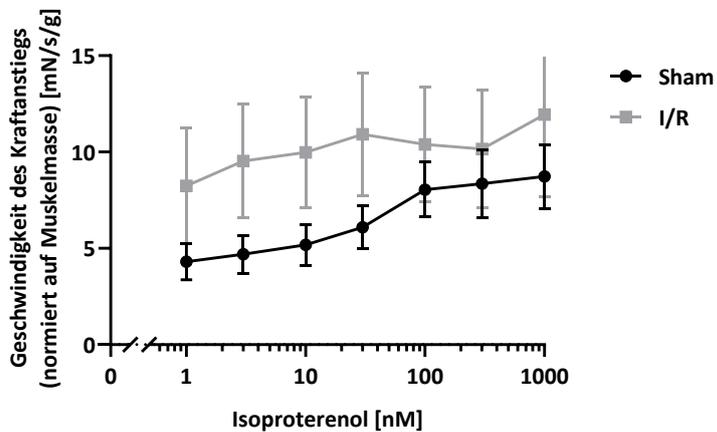


Abb. 31: Graphische Darstellung von Veränderungen der Geschwindigkeiten des Kraftanstieges unter steigenden Isoproterenol-Konzentrationen normiert auf die Muskelmasse

Das Liniendiagramm stellt für jede Isoproterenol-Konzentration die Differenz der jeweiligen Kraftanstiegsgeschwindigkeit zum Ausgangswert ohne Isoproterenol-Zugabe, dividiert durch die Muskelmasse \pm SEM dar. Gemessen wurden die Papillarmuskeln von $n = 9$ der I/R-Gruppe und $n = 10$ der sham-Gruppe unter steigenden Isoproterenol-Konzentrationen (1 – 1000 nM). Messzeitpunkt war 24 Stunden nach I/R bzw. Sham-Induktion bei konstanter Vorspannung des Muskels mit 1 mN.

Die größte Differenz der Kraftanstiegsgeschwindigkeiten von I/R gegenüber Sham wird bei einer Konzentration von 3 nM Isoproterenol ersichtlich. Sie liegt für das *remote* Myokard im Mittel bei $1,72 \pm 2,70$ mN/s/g und für das non-infarzierte Myokard bei $0,44 \pm 0,70$ mN/s/g. Die Signifikanz wird bei einem Konfidenzintervall von 95 % mit $p = 0,16$ verfehlt (Abbildung 32).

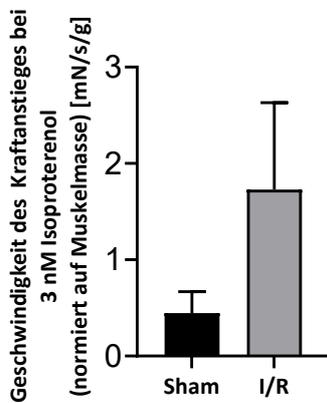


Abb. 32: Graphische Darstellung der Mittelwerte der Kraftanstiegsgeschwindigkeit bei einer Isoproterenol-Konzentration von 3 nM

Das Säulendiagramm stellt die Geschwindigkeit des Kraftanstiegs als Differenz zum Ausgangswert, dividiert durch die Muskelmasse bei einer Isoproterenol-Konzentration von 3 nM \pm SEM dar. Gemessen wurden die Papillarmuskeln von n = 9 der I/R-Gruppe und n = 10 der voroperierten Sham-Gruppe. Messzeitpunkt war 24 Stunden nach I/R bzw. Sham-Induktion unter einer konstanten Frequenz von 60 bpm. Ungepaarter t-Test.

3.3.3. Geschwindigkeit des Kraftanstiegs unter Vorspannung

In der Messung der Geschwindigkeit des Kraftanstiegs unter variierender Vorspannung wird, entsprechend dem Frank-Starling-Mechanismus, bei steigender Vorspannung ein erhöhter Muskeltonus mit steigenden Geschwindigkeiten des Kraftanstiegs erwartet. Möglicherweise gelingt eine Einschätzung, bis zu welcher Vorspannung eine Überlappung der Aktin- und Myosin-Filamente gegeben ist. Zudem ist erneut von Interesse, ob das remote Myokard Einschränkungen hinsichtlich der Kraftanstiegsgeschwindigkeit sowie der Vordehnung besitzt.

Zur Darstellung in Abbildung 33 kommen unter stetig steigenden Vorspannungen der Papillarmuskeln die korrespondierenden Kraftanstiegsgeschwindigkeiten beider Gruppen.

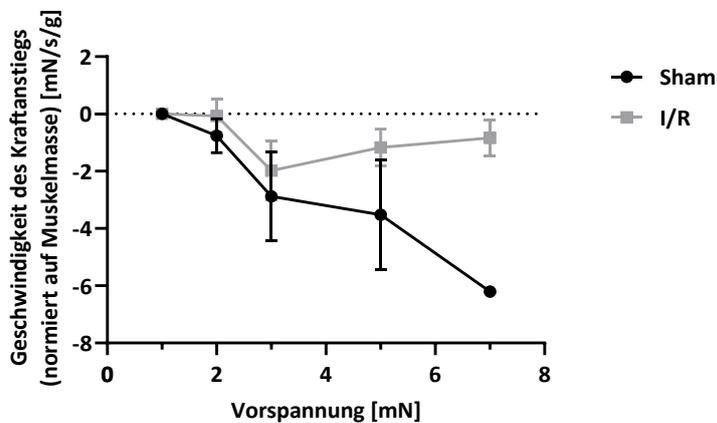


Abb. 33: Graphische Darstellung von Veränderungen der Kraftanstiegsgeschwindigkeiten unter steigender Vorspannung normiert auf die Muskelmasse

Das Liniendiagramm stellt für jede Vorspannung die Differenz der jeweiligen Kraftanstiegsgeschwindigkeit zum Ausgangswert, dividiert durch die Muskelmasse \pm SEM dar. Gemessen wurden die Papillarmuskeln von $n = 9$ der I/R-Gruppe und $n = 10$ der Sham-Gruppe unter steigenden Vorspannungen (1-7 mN). Messzeitpunkt war 24 Stunden nach I/R bzw. Sham-Induktion unter einer konstanten Frequenz von 60 bpm.

I/R kann zunächst die Kraftanstiegsgeschwindigkeit bei einer Vorspannungssteigerung von 1 auf 2 mN halten. Danach kommt es zu einem Abfall der Geschwindigkeit bei 3 mN bevor die Kraftanstiegsgeschwindigkeit danach wieder ansteigt. Das nicht-infarzierte Myokard zeigt dagegen einen steten Abfall der Kraftanstiegsgeschwindigkeit. Über die Ursachen oder mögliche Einflussfaktoren wird in Kapitel 4.4.2. Bezug genommen.

3.4. Geschwindigkeiten des Kraftabfalls

Die Messung der Kraftabfallgeschwindigkeit (Lusitropie) erlaubt eine Aussage über die Relaxationsfähigkeit und somit die diastolische Funktion des Myokards. Nach der Anspannung (Kontraktion) in der Systole kommt es folgend zur Entspannung (Relaxation) des Herzmuskels in der Diastole. Die Relaxationsfähigkeit des Myokards ist,

ebenso wie die Kontraktionsfähigkeit, unter anderem abhängig von der Muskelmasse wie von der Frequenz.

3.4.1. Geschwindigkeit des Kraftabfalls nach elektrischer Stimulation

Entsprechend den Gesetzmäßigkeiten, die bereits in Kapitel 3.2.1. und 3.3.1. beschrieben wurden, sind steigende Kraftabfallgeschwindigkeiten erwartbar. Folgerichtig verkürzt sich das zeitliche Intervall zwischen der Erreichung der maximalen Kraftamplitude und dem vollständigen Tonusverlust.

In Abbildung 34 erkenntlich sind in beiden Gruppen stetig steigende Kraftabfallgeschwindigkeiten unter steigenden Stimulationsfrequenzen. Es besteht eine leichte Tendenz zu reduzierten Geschwindigkeiten des Kraftabfalls bei I/R.

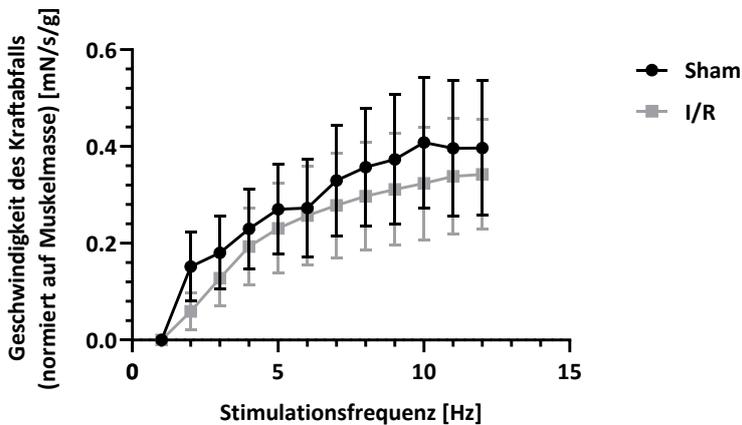


Abb. 34: Graphische Darstellung der Veränderungen der Kraftabfallgeschwindigkeiten unter steigenden Stimulationsfrequenzen normiert auf die Muskelmasse

Das Liniendiagramm stellt für jede Stimulationsfrequenz die Differenz der jeweiligen Kraftabfallgeschwindigkeit zum Ausgangswert, dividiert durch die Muskelmasse bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz \pm SEM dar. Gemessen wurden die Papillarmuskeln von n = 14 der I/R Gruppe und n = 13 der Sham-Gruppe unter steigenden Stimulationsfrequenzen (1 – 12 Hz). Messzeitpunkt war 24 Stunden nach I/R bzw. Sham-Induktion bei konstanter Vorspannung des Muskels mit 1 mN.

Der größte Unterschied zwischen den beiden Gruppen stellt sich bei einer Stimulationsfrequenz von 2 Hz dar (Abbildung 35). Die Geschwindigkeit des Kraftabfalles liegt für das non-infarzierte Myokard mehr als doppelt so hoch mit $0,15 \pm 0,25$ mN/s/g im Vergleich zu $0,05 \pm 0,13$ mN/s/g für das *remote* Myokard. Das infarzierte Myokard kann demnach 74 % weniger Geschwindigkeit für den Kraftabfall generieren. Dies entspricht einem $p = 0,25$ und verfehlt damit das Signifikanzniveau.

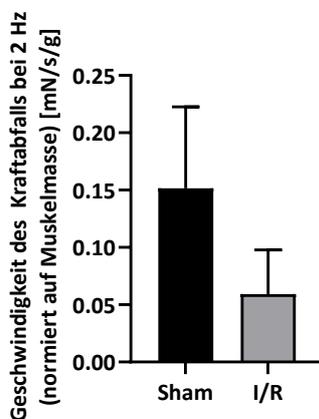


Abb. 35: Graphische Darstellung der Mittelwerte der Kraftabfallgeschwindigkeit bei einer Stimulationsfrequenz von 2 Hz

Das Säulendiagramm stellt die Kraftabfallgeschwindigkeit als Differenz zum Ausgangswert, dividiert durch die Muskelmasse bei einer Stimulationsfrequenz von 2 Hz \pm SEM dar. Gemessen wurden die Papillarmuskeln von $n = 14$ der I/R Gruppe und $n = 13$ der voroperierten Sham-Gruppe. Messzeitpunkt war 24 Stunden nach I/R bzw. Sham-Induktion unter einer konstanten Frequenz von 60 bpm. Ungepaarter t-Test.

3.4.2. Geschwindigkeit des Kraftabfalls unter beta-adrenerger Stimulation

Bewertet werden soll nun die Kraftabfallgeschwindigkeit unter positiv inotroper Stimulation mit Katecholaminen. Auf Basis physikalischer und physiologischer Gesetzmäßigkeiten ist mit steigenden Geschwindigkeiten bei höherer Kraftentwicklung zu rechnen. Es werden erneut die Verläufe der Kraftabfallgeschwindigkeiten als Mittelwerte, über alle Versuchstiere beider Gruppen zu jeder Isoproterenol-Konzentration dargestellt.

In der Sham-Gruppe liegen die Werte der Geschwindigkeit des Kraftabfalls insgesamt etwas niedriger als bei I/R. Eine kontinuierliche Steigerung der Kraftabfallgeschwindigkeit stellt sich in beiden Gruppen dar, mit einer kurzen Plateauphase in der I/R-Kohorte unter Isoproterenol-Konzentrationen von 30 bis 300 nM.

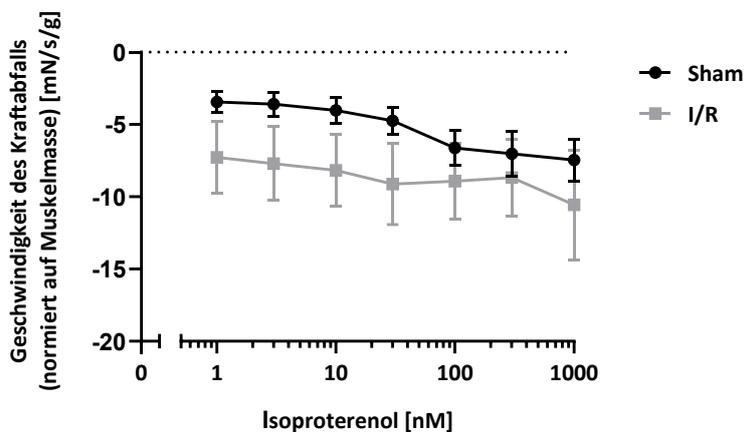


Abb. 36: Graphische Darstellung von Veränderungen der Kraftabfallgeschwindigkeit unter steigenden Isoproterenol-Konzentrationen normiert auf die Muskelmasse

Das Liniendiagramm stellt für jede Isoproterenol-Konzentration die Differenz der jeweiligen Kraftabfallgeschwindigkeit zum Ausgangswert ohne Isoproterenol-Zugabe, dividiert durch die Muskelmasse \pm SEM dar. Gemessen wurden die Papillarmuskeln von $n = 9$ der I/R Gruppe und $n = 10$ der Sham-Gruppe unter steigenden Isoproterenol-Konzentrationen (1 – 1000 nM). Messzeitpunkt war 24 Stunden nach I/R bzw. Sham-Induktion bei konstanter Vorspannung des Muskels mit 1 mN.

Im Bereich einer Isoproterenol-Konzentration von 30 nM ergibt sich die größte Differenz der Messdaten. Für Sham liegt hier der Mittelwert für die Kraftabfallgeschwindigkeit bei $-4,75 \pm 2,92$ mN/s/g und für I/R bei $-9,11 \pm 8,41$ mN/s/g. Folglich ist $p = 0,14$ und verfehlt für diesen Versuch das 95 %-Konfidenzintervall ($p < 0,05$).

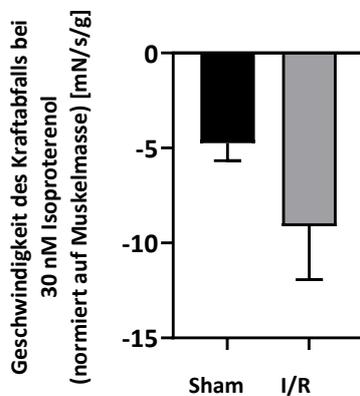


Abb. 37: Graphische Darstellung der Mittelwerte der Kraftabfallgeschwindigkeiten bei einer Isoproterenol-Konzentration von 30 nM

Das Säulendiagramm stellt die Geschwindigkeit des Kraftabfalls als Differenz zum Ausgangswert, dividiert durch die Muskelmasse bei einer Isoproterenol-Konzentration von 30 nM \pm SEM dar. Gemessen wurden die Papillarmuskeln von n = 9 der I/R Gruppe und n = 10 der voroperierten Sham-Gruppe. Messzeitpunkt war 24 Stunden nach I/R bzw. Sham-Induktion unter einer konstanten Frequenz von 60 bpm. Ungepaarter t-Test.

3.4.3. Geschwindigkeit des Kraftabfalls unter Vorspannung

Unter steigenden Vorspannungen ist ein gegenläufiges Verhalten der Kraftabfallgeschwindigkeiten im Vergleich zur Kraftanstiegsgeschwindigkeit zu erwarten. Analog zum Verhalten der Kraftanstiegsgeschwindigkeiten (Kapitel 3.3.2.) nimmt die Geschwindigkeit des Kraftabfalls zunächst bei Steigerung der Vorspannung bis zu 5 mN zu, die Kraftabfallgeschwindigkeit nahezu stabil bleibt für Sham bzw. leicht abnimmt beim *remote* Myokard (siehe Abbildung 38). Insgesamt sind die Kraftabfallgeschwindigkeiten für I/R im Trend reduziert.

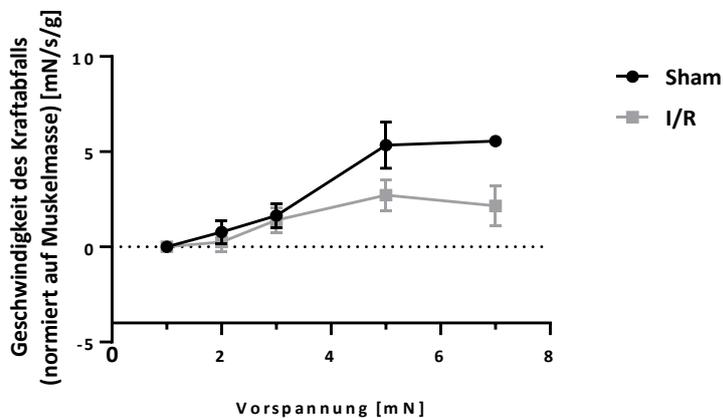


Abb. 38: Graphische Darstellung von Veränderungen der Kraftabfallgeschwindigkeit unter steigender Vorspannung normiert auf die Muskelmasse

Das Liniendiagramm stellt für jede Vorspannung die Differenz der jeweiligen Kraftabfallgeschwindigkeit zum Ausgangswert, dividiert durch die Muskelmasse \pm SEM dar. Gemessen wurden die Papillarmuskeln von $n = 9$ der I/R Gruppe und $n = 10$ der Sham-Gruppe unter steigenden Vorspannungen (1-7 mN). Messzeitpunkt war 24 Stunden nach I/R bzw. Sham-Induktion unter einer konstanten Frequenz von 60 bpm.

Ein größerer Unterschied beider Gruppen ist bei einer Vorspannung von 5 mN gegeben. Für I/R ist der Mittelwert bei $2,72 \pm 1,60$ mN/s/g und für Sham bei $5,33 \pm 1,72$ mN/s/g. Bei $p = 0,13$ findet sich kein signifikanter Unterschied des *remote* Myokard zur Kontrolle. Noch größer ist die Differenz bei einer Vorspannung des Papillarmuskels bei 7 mN. Die Stichprobengröße ist mit $n = 3$ für I/R und $n = 1$ für Sham zu gering.

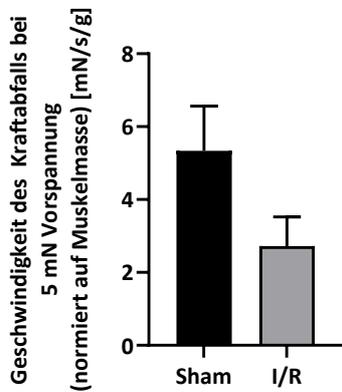


Abb. 39: Graphische Darstellung der Mittelwerte der Kraftabfallgeschwindigkeit bei einer Vorspannung von 5 mN

Das Säulendiagramm stellt die Geschwindigkeit des Kraftabfalls als Differenz zum Ausgangswert, dividiert durch die Muskelmasse bei einer Vorspannung von 5 mN \pm SEM dar. Gemessen wurden die Papillarmuskeln von n = 9 der I/R Gruppe und n = 10 der voroperierten Sham-Gruppe. Messzeitpunkt war 24 Stunden nach I/R bzw. Sham-Induktion unter einer konstanten Frequenz von 60 bpm. Ungepaarter t-Test.

3.5. Vergleiche der Ausgangswerte

Zur Darstellung kommen in diesem Kapitel die Ausgangswerte zu Beginn der Teilversuche zur Provokation mit divergierenden Isoproterenol-Konzentrationen und variablen Vorspannungen. Von Interesse ist, ob der Muskel nach der Stimulation mit einem β -Adrenorezeptor-Agonisten in der Lage ist, in etwa die ursprüngliche Konfiguration vor Versuchsbeginn einzunehmen. Dies könnte eine wesentliche Rolle spielen bei der Bewertung von Einflussfaktoren in aufeinanderfolgenden Versuchen.

3.5.1. Amplituden

In Abbildung 40 werden die Ausgangswerte für die Kraftamplituden visualisiert. Verglichen werden dabei die Werte vor der Isoproterenol-Zugabe sowie vor Beginn der Vorspannungs-Variation. Diese Vergleiche der Gruppen I/R und Sham kommen bereits in Kapitel 3.2.2 Abbildung 24 und Kapitel 3.2.3. Abbildung 28 zur Darstellung, werden

hier aber noch einmal gemeinsam beleuchtet. Zum anderen steht im Interesse der Vergleich innerhalb der Gruppen I/R und Sham. Fragestellung ist hier, ob ein möglicher Kraftverlust oder eine Kraftzunahme ursächlich bedingt sein könnten durch die Stimulation mit Isoproterenol vor Beginn des Versuchsprotokolls mit wechselnden Vorspannungen.

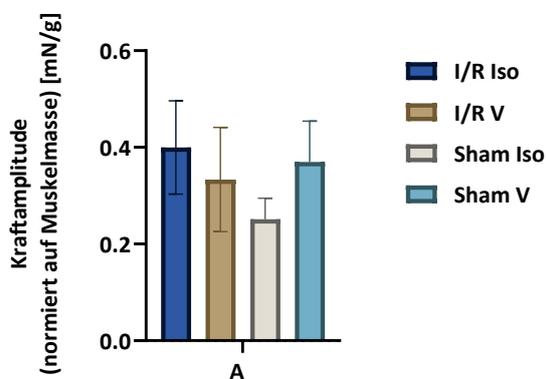


Abb. 40: Graphische Darstellung der Kraftamplituden vor Versuch 2 (β -adrenerge Stimulation) und Versuch 3 (Vorspannung) im Vergleich

Das Säulendiagramm stellt die Kraftamplituden ohne Isoproterenol-Zugabe bzw. nach Isoproterenol-Auswaschung, also vor Beginn der Vorspannungserhöhungen, dividiert durch die Muskelmasse \pm SEM dar. Gemessen wurden die Papillarmuskeln von $n = 9$ der I/R Gruppe und $n = 10$ der Sham-Gruppe. Messzeitpunkt war 24 Stunden nach I/R bzw. Sham-Induktion bei konstanter Vorspannung des Muskels mit 1 mN. I/R Iso = I/R vor Isoproterenol-Zugabe. I/R V = I/R vor Variation Vorspannung. Sham Iso = Sham vor Isoproterenol-Zugabe. Sham V = Sham vor Variation Vorspannung.

Zwischen allen Gruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Die ausgeprägteste Abweichung der Mittelwerte zeigte sich zwischen den Gruppen I/R Iso und Sham Iso, also vor Beginn der Isoproterenol-Zugabe. Die tendenziell niedrigeren Werte in der I/R-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe erreichten aber auch hier keine Signifikanz ($p=0,16$).

Die Ausgangswerte der Kraftamplituden nach dem Auswaschen des Isoproterenols im Organbad und vor Beginn der Versuche mit variablen Vorspannungen, sind in beiden Gruppen nahezu identisch. Der Unterschied in der Kraftamplitude innerhalb I/R zu

Beginn von Versuch 2 und 3 ist ebenfalls marginal. Signifikante Unterschiede innerhalb der Sham-Kohorte für die Kraftamplituden, vor Versuchsbeginn der jeweiligen beiden Bedingungen, sind nicht ermittelbar. Bemerkenswerterweise ist aber die Kraftamplitude der Papillarmuskeln zu Beginn des Vorspannungsversuches höher als im Nativzustand vor Zugabe von Isoproterenol.

3.5.2. Geschwindigkeiten des Kraftanstiegs und -abfalls

Folgend werden hier, analog zur Fragestellung im vorherigen Kapitel 3.5.1., zu den gleichen Zeitpunkten wie benannt, die Kraftanstiegs- und Kraftabfallgeschwindigkeiten dargestellt. Interessant sind wiederum Unterschiede zwischen I/R und Sham sowie innerhalb dieser Gruppen zu den beiden Versuchsausgangsbedingungen.

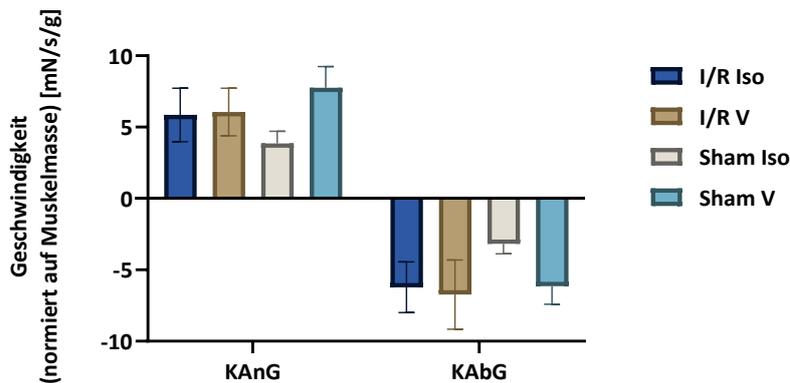


Abb. 41: Graphische Darstellung der Kraftanstiegs- und Kraftabfallgeschwindigkeiten vor Versuch 2 (β -adrenerge Stimulation) und Versuch 3 (Vorspannung) im Vergleich

Das Säulendiagramm stellt die Geschwindigkeiten des Kraftanstiegs und -abfalls ohne Isoproterenol-Zugabe bzw. nach Isoproterenol-Auswaschung, dividiert durch die Muskelmasse \pm SEM dar. Gemessen wurden die Papillarmuskeln von $n = 9$ der I/R Gruppe und $n = 10$ der Sham-Gruppe. Messzeitpunkt war 24 Stunden nach I/R bzw. Sham-Induktion bei konstanter Vorspannung des Muskels mit 1 mN. I/R Iso = I/R vor Isoproterenol-Zugabe. I/R V = I/R vor Variation Vorspannung. Sham Iso = Sham vor Isoproterenol-Zugabe. Sham V = Sham vor Variation Vorspannung. KANg = Kraftanstiegsgeschwindigkeit. KAbG = Kraftabfallgeschwindigkeit.

Auffällig ist, dass die Differenzen in den Mittelwerten der Kraftanstiegs- und Kraftabfallgeschwindigkeiten in der Sham-Gruppe, vor Beginn des Teilversuches unter der Variation der Vorspannung, etwa doppelt so groß sind wie vor Beginn der Stimulation durch Isoproterenol. Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. In der I/R-Gruppe ist dieser Trend auch erkennbar, jedoch weniger ausgeprägt.

4. Diskussion

4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

In Anbetracht aller Daten anhand des Maus-Modells zur funktionellen Bewertung des *remote* Myokards in der Frühphase nach Myokardinfarkt können folgende Ergebnisse verzeichnet werden. In allen Versuchsmodellen ergaben sich im Vergleich zu Papillarmuskeln aus sham-operierten Tieren Tendenzen des *remote* Myokards zu verminderter Kraftentwicklung und Kontraktionsfähigkeit unter steigenden Stimulationsfrequenzen sowie unter erhöhten Muskelvorspannungen. Unter β -adrenerger Stimulation weist das *remote* Myokard höhere Kraftamplituden und Kraftanstiegs- und Kraftabfallgeschwindigkeiten auf. Signifikante Unterschiede zwischen I/R und Kontrollgruppe wurden lediglich für die kontraktile Amplitude unter einer Vorspannung von 5 mN erreicht. Die in dieser Arbeit durchgeführten Kraftmessungen in isolierten Papillarmuskeln erhärten somit die Annahme, dass es im *remote* Myokard in der Akutphase nach Myokardinfarkt zu Funktionseinschränkungen kommen kann [33,36,77,78].

4.2. Stimulation mit Frequenzmodulation

4.2.1. Amplituden unter Frequenzmodulation

Bewertet wurden die Amplituden und damit die Kraftentwicklung von Papillarmuskeln als Surrogat des *remote* Myokards 24 Stunden nach I/R. Kontraktilität ist dabei die Fähigkeit des Myokards, Druck in einer bestimmten Geschwindigkeit aufzubauen. Unter steigenden Frequenzen nehmen die Kraftentwicklung und am intakten Herzen das Schlagvolumen kontinuierlich ab.

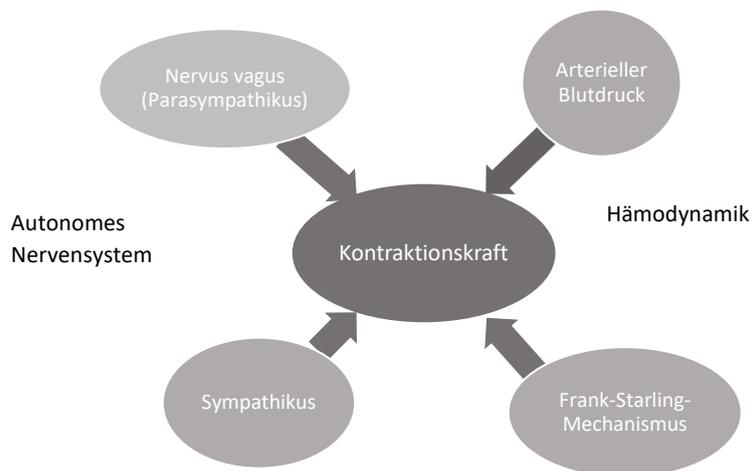


Abb. 42: Beziehungsdigramm der Mechanismen zur Beeinflussung der Kontraktionskraft

Mechanismen des autonomen Nervensystems sowie der Hämodynamik nehmen Einfluss auf die Kontraktionskraft. Der Nervus vagus ist Teil des parasympathischen Nervensystems und hat negativ chronotropen Einfluss auf den Sinusknoten und negativ dromotrope Effekte auf den AV-Knoten. Der Sympathikus steuert über beta-adrenerge Rezeptoren positiv inotrop die Kontraktionskraft der Ventrikel und positiv chronotrop durch Innervation des Sinusknotens die Herzfrequenz. Der periphere arterielle Druck ist für die Größe der Nachlast verantwortlich. Der Frank-Starling-Mechanismus regelt, wie bereits zuvor erwähnt, den Zusammenhang zwischen Schlagvolumen und Kontraktionskraft. Der posteriore Papillarmuskel des linken Ventrikels wurde isoliert, im Organbad befestigt und bei einer Vorspannung von 1 mN und einer Basisfrequenz von 1 Hz folgend zunehmenden Frequenzen ($\Delta 1\text{Hz}$) bis 12 Hz ausgesetzt. Nahezu stabil konnte in beiden Gruppen, I/R (n = 14) und Sham (n = 13) die Frequenz von Kontraktion und Relaxation pro 1 Hz um 60 bpm gesteigert werden. Vereinzelt kam es in beiden Gruppen ab 11 Hz zu einem Frequenzabfall, weil nicht jede elektrische Stimulation zu einer Kontraktion führte. Diese Daten wurden dennoch in die Auswertung einbezogen. Bei Ausschluss dieser Daten ergaben sich keine signifikanten Änderungen der Ergebnisse. Den Daten ist zu entnehmen, dass die Kontraktionskraft des *remote* Myokards in der Tendenz, wenn auch ohne Signifikanz, reduziert ist. Spekuliert werden kann demnach

über eine Einschränkung der kontraktile Reserve des *remote* Myokards, wofür bereits weitere Publikationen Anhalte liefern [36,78].

Diverse Publikationen weisen ebenfalls in klinischen Studien [79,80] und Tierversuchsmodellen [78,81] reduzierte enddiastolische Drücke und damit eine Verminderung der Kraftentwicklung (Inotropie) des *remote* Myokards nach.

Zur Normalisierung der Daten wurden sie auf das Nassgewicht des Papillarmuskels bezogen. Kritisch betrachtet werden muss hier zum einen die quantitativ nicht zu beziffernde Menge an Tyrode-Lösung, die mit gewogen wurde. Der Messwert spiegelt demnach nicht allein das Gewicht des Papillarmuskels wider. Der Hintergrund war die Idee, das Gewicht der Muskeln mit Durchmesser und damit der Menge an kontraktile Elementen gleichzusetzen. Physiologisch ist dies jedoch kritisch zu sehen und eine Normalisierung auf die Querschnittsflächen der Papillarmuskeln vorzuziehen, weil die gemessene Kraft letztlich aus der Summe der parallel angeordneten Fasern der Papillarmuskeln resultiert. Dies konnte in diesem Versuchsaufbau nicht erfolgen, da die Papillarmuskeln nicht in Paraffin eingebettet und asserviert wurden. Es wird zu prüfen sein, ob sich hinsichtlich der Reduktion der Kontraktilität des *remote* Myokards bei Normalisierung der Rohwerte auf die Querschnittsflächen der Papillarmuskeln Unterschiede ergeben.

4.2.2. Geschwindigkeit des Kraftanstiegs unter Frequenzmodulation

Bei gleichen Bedingungen mit einer Vorspannung von 1 mN, einer elektrischen Grundfrequenz von 1 Hz und folgend einer Steigerung um jeweils $\Delta 1\text{Hz}$ bis 12 Hz, wurden die Kraftanstiegsgeschwindigkeiten für die Papillarmuskeln des *remote* Myokard (I/R n = 14) und der Vergleichsgruppe (Sham n = 13) ermittelt und verglichen. Die Kraftanstiegsgeschwindigkeit unterliegt den in Kapitel 3.1. beschriebenen Gesetzmäßigkeiten. Im Versuchsaufbau der Amplituden unter variablen Frequenzen waren mit der Steigerung der Frequenzen niedrigere Amplituden zu verzeichnen. Sinkt also die Kontraktionskraft, sinken auch die Kraftanstiegsgeschwindigkeiten. Tendenziell, aber nicht signifikant, sind die Kraftanstiegsgeschwindigkeiten der I/R

etwas höher als bei Sham (Abbildung 30). Dies könnte für eine höhere Kraftmenge sprechen, die das *remote* Myokard aufbringen kann. Die Ergebnisse der Amplituden (Kapitel 3.2.1.) weisen keinen signifikanten Unterschied von I/R zu Sham nach. Die Normalisierung auf den Muskelquerschnitt liefert hier gegebenenfalls weitere Erkenntnisse.

4.2.3. Geschwindigkeit des Kraftabfalls unter Frequenzmodulation

Analog zu den Kraftanstiegsgeschwindigkeiten wurden bei gleichem Versuchsaufbau auch die Kraftabfallgeschwindigkeiten ermittelt. Da Amplituden anhand sinusförmiger Kurvenverläufe ermittelt werden, sollten sich die Kraftabfallgeschwindigkeiten gegenläufig zu den Kraftanstiegsgeschwindigkeiten verhalten. Es werden demnach steigende Kraftabfallgeschwindigkeiten unter höheren Frequenzen erwartet. Die Datenlage dazu zeigt in Abbildung 34 diesen Effekt. Wobei die Geschwindigkeiten der I/R-Gruppe im Trend minimal niedriger sind als in der Sham-Vergleichsgruppe. Eine Signifikanz kann auch hier kongruent zu den Kraftamplituden und Kraftanstiegsgeschwindigkeiten nicht eruiert werden.

4.2.4. Zusammenfassung zur Frequenzmodulation

Die Effekte auf das *remote* Myokard nach Steigerung der Chronotropie zeigen in allen Versuchsteilen die physiologisch erwarteten Ergebnisse. Es kann in der Tendenz von einer Funktionseinschränkung des *remote* Myokards ausgegangen werden. Es stellt sich jedoch die Frage, in welcher Konstellation hierzu signifikante Unterschiede erhoben werden können. Eine Möglichkeit wäre die Normalisierung auf die Durchmesser oder besser noch die Querschnittsflächen der Papillarmuskeln. Nur dieser Parameter erlaubt eine Korrelation zur Anzahl der parallel angeordneten kontraktilen Einheiten des Muskels. Eine Normierung auf das Nassgewicht der Papillarmuskeln birgt die Problematik einer nicht quantifizierbaren Menge an Tyrode-Lösung, die mit gewogen wird. Publikationen zur Kraftgenerierung im *remote* Myokard für einen Datenvergleich liegen aktuell nicht vor.

4.3. Stimulation mit Isoproterenol

Für dieses Protokoll, wie auch für das folgende Protokoll der Vorspannungen in Kapitel 4.4., wurden andere Versuchstiere als im Versuchsaufbau variabler Frequenzen verwendet. Es hielten die Daten von $n = 9$ für I/R und $n = 10$ für Sham Einzug in die Auswertung. Unter einer Stimulation mit Isoproterenol als Sympathomimetikum werden positiv inotrope, chronotrope und dromotrope Effekte erwartet. Die Wirkweise von Katecholaminen wurde in Kapitel 1.6. ausführlich dargestellt. Von Interesse waren erneut signifikante Unterschiede zwischen dem *remote* Myokard und der Vergleichsgruppe hinsichtlich Amplitude und Kinetik der Kraftgenerierung.

4.3.1. Amplituden unter beta-adrenerger Stimulation

Die Abbildung 25 zeigt Werte für die Kontraktionskraft, visualisiert als Amplitude, des *remote* Myokards bei einer festgelegten Stimulationsfrequenz von 60 bpm und einer Vorspannung von 1 mN bei I/R $n = 9$ und Sham $n = 10$. Die Amplituden wurden dabei für jede Maus über 10 Schwingungen gemessen und gemittelt und folgend diese Mittelwerte über $n = 9/10$ erneut gemittelt. Erkennbar ist im Trend, wie zu erwarten, in beiden Gruppen eine Steigerung der generierten Kraft aufgrund der positiv inotropen Wirkung des Isoproterenols. Die Amplitude ist dabei abhängig von diversen Faktoren wie der Konzentration endogener Katecholamine [82], der Höhe des intrazellulären Calciums [83], ATP [84,85], oxidativer Stress mit Beeinflussung von Proteinen für den intrazellulären Calciumzyklus und die Ryanodin-Rezeptoren [86], SERCA-Aktivität [87] und vom Ausmaß der Inflammation [70]. In der Sham-Gruppe ist der Anstieg der Kontraktionskraft ausgeprägter als in der I/R-Gruppe. Die Absolutwerte sind in der I/R-Gruppe insgesamt höher, jedoch nicht signifikant unterschiedlich. Der tendenzielle Anstieg ist möglicherweise mit der nach Ischämie höheren Sensitivität der Betarezeptoren für endo- und exogene Katecholamine zu erklären [79,88]. Eine Empfehlung der American Heart Association ist nicht zuletzt deshalb bereits seit 1995,

die Einnahme von (β 1-selektiven) Betablockern bei und nach Myokardinfarkt zur Senkung der Mortalität und Re-Infarkt-Prophylaxe [89]. In einer Publikation von *Lipskaia et al.* [90] wurden die mRNA-Expressionen von Isoformen der im sarkoplasmatischen Retikulum befindlichen Calcium (Ca^{2+})-ATPase (*SERCA*) in 8 Wochen alten voroperierten (Sham) und I/R-Mäusen gemessen. Da die Höhe der Amplitude beeinflusst wird durch die Ca^{2+} -Konzentration im SR, sind höhere Konzentrationen von Ca^{2+} und SERCA mit einer höheren Amplitude assoziiert.

Auch das atriale natriuretische Peptid (*ANP*) spielt eine wesentliche Rolle im Remodeling. In einer Publikation von *Prunier et al.* [91] an adulten Ratten im I/R-Versuch wurden die Versuchstiere drei Monate nach I/R in drei Gruppen eingeteilt. Eine Gruppe Sham-operierter Tiere, eine Gruppe I/R-Ratten ohne HF und eine Gruppe I/R-Ratten mit HF. Untersucht wurden folgend das linksventrikuläre Remodeling und die Funktion mittels Echokardiographie und hämodynamischer Tests sowie die Höhe der mRNA-Expression der im endo- und sarkoplasmatischen Retikulum befindlichen Calcium-ATPase 2a (*SERCA2a*) und des ANP. ANP wird bei Volumenbelastung der Vorhöfe freigesetzt und kann somit als indirektes Zeichen einer konsekutiven HF gewertet werden. Somit ist es nicht verwunderlich, dass in der Sham-Gruppe keine ANP-Freisetzung im Vergleich zu einer moderaten Freisetzung bei den Tieren der I/R-Gruppe ohne HF und höheren ANP-Konzentrationen in der Gruppe mit konsekutiver HF zu verzeichnen waren. Die Konzentration der *SERCA2a*-mRNA war zum Teil in den I/R-Ratten ohne HF in Korrelation zur Sham-Gruppe erhöht, was für einen höheren Ca^{2+} -Einstrom und somit eine höhere Kontraktionskraft sprechen könnte. Die Publikationen sind hierzu different und offenbar vor allem abhängig von dem Vorhandensein oder der Entwicklung einer relevanten Herzinsuffizienz.

Eine Publikation von *Sen et al.* [87] untersuchte zwei Patientengruppen. Die erste Gruppe enthielt Patienten mit einer ischämischen Kardiomyopathie. Die zweite Gruppe setzte sich aus Patienten mit einer idiopathischen Kardiomyopathie zusammen. Man isolierte Kardiomyozyten beider Patientengruppen und fand bei Gruppe 1 (ischämische Kardiomyopathie) eine erhöhte *SERCA*-Aktivität im Gegensatz zur Gruppe 2 (idiopathische Kardiomyopathie), deren *SERCA*-Aktivität vergleichbar zur Kontrollgruppe war.

Kronenbitter et al. konnten in isolierten Kardiomyozyten des *remote* Myokards von C57BL/6J Mäusen 24 Stunden nach I/R keine Änderungen in der Expression von Calcium-Regulatorproteinen im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisen. Dennoch war die Aktivität der SERCA2a reduziert, wie direkte Messungen des intrazellulären Ca^{2+} -Transports in Kardiomyozyten des *remote* Myokards zeigten. Ursache dafür war eine reduzierte Phosphorylierung und dadurch verstärkte Wirkung des SERCA2a-Inhibitors Phospholamban. Infolgedessen waren die kontraktile Amplitude der Sarkomere signifikant und die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeiten im Trend reduziert [36]. Durch Isoproterenol-Stimulation waren die Defekte reversibel.

4.3.2. Geschwindigkeit des Kraftanstiegs unter beta-adrenerger Stimulation

Die β -adrenerge Stimulation mittels Isoproterenol nimmt Einfluss auf Signalkaskaden in Kardiomyozyten und damit den Calciumkreislauf (siehe Kapitel 1.6.7. und 4.3.1.). Die Geschwindigkeiten des Kraftanstiegs verhalten sich analog zu den kontraktile Amplituden und sind steigend unter höheren Isoproterenol-Konzentrationen. Bei konstanter Frequenz von 60 bpm werden unter steigenden Isoproterenol-Konzentrationen höhere Amplituden zu einem bestimmten Zeitpunkt erreicht. Folgerichtig wird mehr Kraft in einer bestimmten Zeit generiert, sodass die Kraftanstiegsgeschwindigkeit erhöht wird.

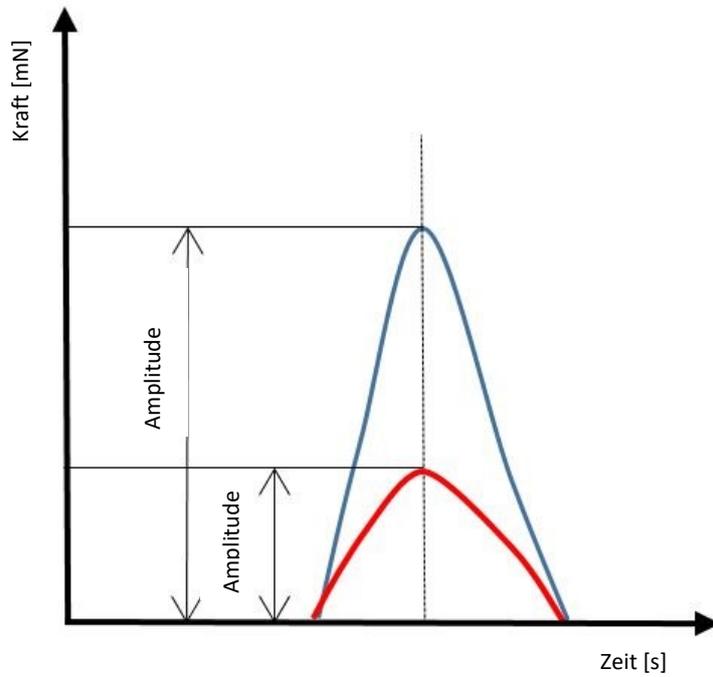


Abb. 43: Schematisches Kraft-Zeit-Diagramm mit Darstellung der Kraftanstiegsgeschwindigkeit

Rote Kurve = exemplarische Kurvendarstellung mit niedrigerer Amplitude unter niedrigerer Isoproterenol-Konzentration. Blaue Kurve = exemplarische Kurvendarstellung mit höherer Amplitude unter höherer Isoproterenol-Konzentration.

Anhand von Abbildung 43 wird die Ermittlung von Kraftanstiegs- und Kraftabfallgeschwindigkeit schematisch dargestellt. Mathematisch errechnen sich die Werte für die Kraftanstiegsgeschwindigkeit aus dem höchsten Punkt der Kurve mit der höchsten Kraftentwicklung, subtrahiert mit dem niedrigsten Punkt der Kurve bezogen auf die Zeit von einer Sekunde. Die angewandte Suchmethodik hat keine vergleichbaren Publikationen zur mechanischen Funktion, insbesondere der Kraftanstiegsgeschwindigkeiten, ergeben.

4.3.3. Geschwindigkeit des Kraftabfalls unter beta-adrenerger Stimulation

Die mathematische Berechnung der Kraftabfallgeschwindigkeit ist analog zur Kraftanstiegsgeschwindigkeit nur für den fallenden Anteil der beiden schematisch in Abbildung 43 dargestellten Kurven zu ermitteln. Die experimentelle Datenlage dieser Arbeit zeigt für die Kraftabfallgeschwindigkeiten unter β -adrenerger Stimulation steigende Kraftabfallgeschwindigkeiten. Die Geschwindigkeit des Kraftabfalles ist in beiden Gruppen sukzessive. Wobei I/R in der Tendenz stärker negative und damit höhere Geschwindigkeiten des Kraftabfalls zeigt. Eine Limitierung der Kraftabfallgeschwindigkeit scheint I/R ab einer Isoproterenol—Konzentration von 30 nM zu erreichen, da sich ab diesem Zeitpunkt eine Reduktion der Kraftabfallgeschwindigkeit vollzieht. Zu keiner Bedingung kann jedoch ein signifikanter Unterschied eruiert werden. Durch die angewandte Suchmethodik, wurde kein Ergebnis erzielt, welches vergleichende Publikationen aufgezeigt hat. Weitere dezidierte Versuche, ebenfalls mit Normalisierung auf die Querdurchmesser, wären wünschenswert.

4.4. Stimulation unter Vorspannung

Durch Variation der Vorspannung wird die Länge der Sarkomere sukzessive vergrößert und darunter das Ausmaß und die Kinetik der Kraftgenerierung in den Papillarmuskeln ermittelt. Verwendet wurden für I/R $n = 9$ und für Sham $n = 10$. Unter einer konstanten Frequenz von 60 bpm, einer elektrischen Stimulation von 1 Hz und einer basalen Vordehnung von 1 mN wurde die Vorspannung kontinuierlich von 2 bis 10 mN gesteigert. Das Protokoll umfasste eine Steigerung der Vorspannung bis 25 mN, es konnten jedoch lediglich maximal vereinzelt 7 mN erreicht werden. Stabile Ergebnisse ergaben sich bis etwa 5 mN.

4.4.1. Amplituden unter variabler Vorspannung

Dieser Versuchsaufbau schließt sich unmittelbar an das Protokoll der β -adrenergen Stimulation an. Die Variation der Vorspannung simuliert die Bedingung einer erhöhten Volumenbelastung und gegebenenfalls, einer im Verlauf nach myokardialer Ischämie resultierenden, Herzinsuffizienz im Rahmen einer dilatativen Kardiomyopathie [92]. In Abbildung 28 sind die ermittelten Daten zu den kontraktile Amplituden als auf das Gewicht der Papillarmuskeln normierte Werte dargestellt. Es finden sich kontinuierlich steigende Amplituden, bis 3 mN für I/R und 5 mN für Sham, mit einer reduzierten Steigung von I/R bei auch insgesamt niedrigeren Amplituden. Gemäß dem Frank-Starling-Mechanismus resultieren aus höheren Schlagvolumina (erhöhter Vorlast), analog zur Erhöhung der Vorspannung, höhere linksventrikuläre Drücke. Somit waren erhöhte kontraktile Amplituden in der Kontrollgruppe zu erwarten. Eine höhere EF und höhere linksventrikuläre Drücke sind dabei mit einem niedrigeren Mortalitätsrisiko verbunden [93]. In einer Publikation von *Kötter et al.* konnte bei C75/BL6J-Mäusen in 2 Gruppen mit I/R von 80 Minuten und permanenter Ligatur der LAD gezeigt werden, dass die Ausprägtheit der Steifigkeit der Myozyten durch eine erhöhte Konzentration von Titin bedingt ist [94]. *Hanatani et al.* ermittelten ähnliche Ergebnisse 48 Stunden nach I/R. Sie konnten eine erhöhte systolische und diastolische Dysfunktion, erhöhte enddiastolische Drücke im linken Ventrikel und reduzierte Sarkomerlängen, sowohl im Bereich der Borderzone als auch im *remote* Myokard, nachweisen. Auf genetischer Ebene sind ANP (atrialess natriuretisches Peptid) und Alpha-Aktin der Skelettmuskulatur reduziert. Diese Ergebnisse sind kongruent zu den in dieser Arbeit ermittelten Daten. Die kontraktile Amplituden des *remote* Myokards waren insgesamt in der Tendenz niedriger in Bezug zur Kontrollgruppe. Eine Signifikanz ergibt sich lediglich für eine Vorspannung von 5 mN. Die Datenmenge ist jedoch mit $n = 2$ für die Kontrollgruppe und $n = 4$ für I/R sehr gering. Eine signifikant niedrigere Amplitude unter erhöhter Vorspannung ist somit bedingt für das *remote* Myokard zu postulieren.

4.4.2. Geschwindigkeit des Kraftanstiegs unter variabler Vorspannung

Die Daten zur Kraftanstiegsgeschwindigkeit unter variabler Vorspannung sind ebenso unter dem in Kapitel 4.4.1. benannten Kenntnisstand der Wissenschaft zu beurteilen. Analog zum Vergleich und der Entwicklung der Kraftamplituden und der Kraftanstiegsgeschwindigkeit unter beta-adrenerger Stimulation, werden auch hier – mindestens initial - bei steigenden Amplituden korrespondierend steigende Kraftanstiegsgeschwindigkeiten des *remote* Myokards erwartet. Die Ergebnisse dieser Arbeit allerdings zeigten fallende Kontraktionsgeschwindigkeiten unter steigenden Vorspannungen, allenfalls nach der ersten Steigerung auf 2 mN waren die Werte noch bis 3 mN nahezu konstant. Die Höhe der Kraftamplitude ist im Gruppenvergleich, unter variabler Vorspannung, bei maximal 0,55 mN für die Kontrollgruppe und 0,18 mN für I/R. Im Vergleich zu β -adrenerger Stimulation werden niedrigere Amplituden erreicht, mit 0,16 mN für Sham und 0,11 mN für I/R. Daher erscheint ein Messfehler unwahrscheinlich. Eine Beeinflussung des vorangegangenen Versuchs der β -adrenergen Stimulation kann nicht ausgeschlossen werden. In den Abbildungen 40 und 41 aus Kapitel 3.5.1 und 3.5.2. ersichtlich, werden trotz gründlicher Spülung und Kalibrierung vor dem Beginn des Vorspannungsversuches, die Ausgangswerte zu Beginn des Ausgangsversuches der β -adrenergen Stimulation für die Amplitude, Kraftanstiegs- und Kraftabfallgeschwindigkeit nicht erreicht. Eine gründliche Spülung des Organbades mit der Tyrode-Lösung sollte Isoproterenol vollständig eliminieren. Die folgende 3-minütige Kalibrierungsphase war adaptiert an die Halbwertszeit von Isoproterenol mit 2,5 bis 5 Minuten [95]. Unter Umständen war die Kalibrierungszeit zu kurz gewählt und Teile der β -Rezeptoren vor Beginn der Vordehnung noch durch Isoproterenol besetzt, was zu höheren Ausgangswerten vor Versuchsbeginn führte.

Zu bedenken ist ebenfalls die geringe Datenmenge gerade in den höheren Vorspannungsbereichen, die das Ergebnis verzerren könnte. Die folgende Tabelle zeigt die Anzahl n für die einzelnen Vorspannungen.

Vorspannung [mN]	Sham (n=10)	I/R (n=9)
1	n=10	n=9
2	n=10	n=9
3	n= 8	n=8
5	n=2	n=4
7	n=1	n=3

Tabelle 6: Anzahl der Versuchstiere für jede Vorspannung

Dargestellt wird die Anzahl der Versuchstiere, die zur Auswertung der Kraftanstiegsgeschwindigkeit ausgewertet wurden.

Die jedoch bereits ab der niedrigsten Vorspannung von 2 mN abfallenden Kraftanstiegsgeschwindigkeiten können nicht über die kleine Stichprobengröße erklärt werden. Für diesen Effekt kann möglicherweise die mechanisch schwierige Stabilisierung der jeweiligen Vorspannung verantwortlich sein. Im niedrigeren Vorspannungsbereich von 2 mN gelang es gut, mit einmaliger Einstellung stabile Vorspannungen zu erreichen. In den höheren Bereichen von 3, 5 und 7 mN gelang die direkte Einstellung dieser Vorspannungen überwiegend nur wenige Sekunden, ehe die Vorspannung abfiel und manuell mechanisch erneut eingestellt werden musste. Teilweise war dies auch mehrfach notwendig, ehe lange genug die gewünschte Vorspannung über 10 Amplituden erreicht werden konnte. Es ist nicht auszuschließen, dass durch diesen Vorgang mehr mechanische Dehnung in diesen Messbereichen auf den Papillarmuskel eingewirkt hat.

4.4.3. Geschwindigkeit des Kraftabfalls unter variabler Vorspannung

Es wurden für diesen Versuch pro erhöhter Vorspannung entsprechend auch steigende Kraftabfallgeschwindigkeiten, korrespondierend zu steigenden Kraftanstiegsgeschwindigkeiten, erwartet. Wie die Ergebnisse (Kapitel 3.4.3.) zeigen, war dies nicht der Fall. Zu den möglichen Einflussfaktoren wurde bereits in Kapitel 4.4.2. Stellung genommen. Für die Möglichkeit des Papillarmuskels zum Kraftabfall sind folgende Mechanismen notwendig. Zum Ersten das Auseinanderweichen der Sarkomere in ihren Entspannungszustand. Ermöglicht wird dies zum einen durch die Bindung von

ATP am Myosinköpfchen und der damit ausgelösten Lösung der Aktin-Myosin-Bindung (Kapitel 1.5.2. Abbildung 11). Zum Zweiten hat der Muskel, wie in Kapitel 1.5.3. beschrieben, bei einer Dehnung über die Gleichgewichtslage das Bestreben, sich zusammenzuziehen. Dies wird überwiegend über Titin-Moleküle reguliert und als passive Rückstellkraft bezeichnet. Kommt es nun zur Überdehnung, fehlt zum einen die Bindung von Aktin an Myosin, wodurch der Querbrückenzyklus nicht mehr stattfinden kann. Des Weiteren sind die Titin-Moleküle gegebenenfalls selbst beschädigt. Referenzen fanden sich hier lediglich zu Mutationen des Titins und dadurch bedingter hypertropher oder dilatativer Kardiomyopathie [96].

5. Schlussfolgerung

Bezugnehmend auf die Fragestellung in Kapitel 1.8. können folgende Ergebnisse konstatiert werden.

Hinsichtlich der Inotropie des *remote* Myokards verdichtet sich durch diese Arbeit die Annahme einer reduzierten kontraktilen Funktion. Die Amplituden und Kraftanstiegs- und Kraftabfallgeschwindigkeiten sind in zwei Versuchsteilen im Trend für das *remote* Myokard eingeschränkt. Lediglich durch β -adrenerge Stimulation ist das *remote* Myokard in der Lage, höhere Kraftamplituden, Kraftanstiegs- und Kraftabfallgeschwindigkeiten und damit eine höhere Inotropie aufzuweisen als die Kontrollgruppe. Während das non-infarzierte Myokard aber kontinuierlich auch in höheren Konzentrationen von Isoproterenol in der Lage ist, positiv inotrope Effekte zu zeigen, ist das *remote* Myokard dazu nicht mehr imstande. Unter steigender Vorspannung des Papillarmuskels wies das *remote* Myokard sogar eine signifikant niedrigere Kraftamplitude auf. Die Lusitropie des *remote* Myokards kann demnach auch als beeinträchtigt angesehen werden.

Die Steigerung der elektrischen Stimulationsfrequenz der Papillarmuskeln erbrachte allenfalls im Trend im höheren Frequenzbereich reduziertere Kraftanstiegs- und Kraftabfallgeschwindigkeiten des *remote* Myokards im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Kraftamplituden verhalten sich unter Frequenzmodulation in beiden Gruppen identisch.

Es werden mehr signifikante Ergebnisse unter Normalisierung auf die Querschnitte der Papillarmuskeln zur besseren Korrelation mit den kontraktilen Einheiten erwartet. Dies bedarf jedoch weiterer Forschung.

Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt. Todesursachenstatistik: Sterbefälle (absolut, Sterbeziffer, Ränge, Anteile) für die 10/20/50/100 häufigsten Todesursachen (ab 1998) [Gliederungsmerkmale: Jahre, Region, Alter, Geschlecht, ICD-10]. Bonn; 2023
2. Statistisches Bundesamt. Sterbefälle Deutschland 2016 - 2023: Fallzahlen nach Tagen, Wochen, Monaten, Altersgruppen, Geschlecht und Bundesländer; 2023
3. Heller, G.; Babitsch, B.; Günster, C.; Möckel, M. Mortality Following Myocardial Infarction in Women and Men. Deutsches Ärzteblatt; 2008; DOI: 10.3238/arztebl.2008.0279
4. Aigali Kudaibergenow. Langzeit-Sterblichkeit nach Herzinfarkt: Alter, Gewicht und Akuttherapie sind entscheidende Faktoren. Mannheim; Presstext DGK 04/2018
5. Aigali Kudeibergenov. 5-Jahres-Outcomenach STEMI - welche Patienten haben den besten Langzeit-Verlauf?; Presstext DGK 04/2018
6. Deutsche Herzstiftung e.V. Das menschliche Herz: Anatomie und Aufbau. Im Internet: herzstiftung.de/ihre-herzgesundheit/das-herz/anatomie-und-aufbau; Stand: 05.06.2023
7. Treuting, P. M., Dintzis, S. M., Montine, K. S., Laflamme, M. A., Sebastian M. M., Buetow, B. S. Comparative Anatomy and Histology: A Mouse, Rat an Human Atlas: 10 - Cardiovascular. Second Edition. San Diego, CA, USA: Academic Press; 2018; ISBN: 978-0128029002
8. Riede, Ursus-Nikolaus, Martin Werner. Allgemeine und spezielle Pathologie; Springer Verlag, 2017; DOI: 10.1007/978-3-662-48725-9
9. Erdmann, E. Klinische Kardiologie: Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße. 8. Auflage. Berlin: Springer-Verlag GmbH; 2011; ISBN: 978-3642164804

10. Schünke, M., Schulte, E., Schumacher, U., Voll, M., Wesker, K. Prometheus Innere Organe. 6. vollständig überarbeitete und erweiterte. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG Stuttgart - New York; 2022. ISBN: 978-3132444171

11. Fernández, B.; Durán, A. C.; Fernández, M. C.; Fernández-Gallego, T.; Icardo, J. M.; Sans-Coma, V. The coronary arteries of the C57BL/6 mouse strains: implications for comparison with mutant models. *J Anat*; 2008; 11:12-18; DOI: 10.1111/j.1469-7580.2007.00838.x

12. Yoldas A., Ozmen E., Ozdemir V. Macroscopic description of the coronary arteries in Swiss albino mice (*Mus musculus*). *J S Afr Vet Assoc.*; 2010; 81(4)//4 :247-252, DOI: 10.4102/jsava.v81i4.156

13. Chen J., Ceholski DK., Liang L., Fish K., Hajjar RJ. Variability in coronary artery anatomy affects consistency of cardiac damage after myocardial infarction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 2017; 313(2) // 2: H275-H282; DOI: 10.1152/ajpheart.00127.2017

14. Kolesová H., Bartoš M., Hsieh WC., Olejníčková V., Sedmera D. Novel approaches to study coronary vasculature development in mice. *Dev Dyn*; 2018; 247(8) // 8: 1018–1027; DOI: 10.1002/dvdy.24637

15. Feng H-Z, Jin J-P. High efficiency preparation of skinned mouse cardiac muscle strips from cryosections for contractility studies. *Exp Physiol*; 2020, 11:1869–1881; DOI: 10.1113/EP088521

16. Jäckel M., Bode C., Staudachter D.. Der akute Myokardinfarkt: Leitliniengerechte Therapie in der Präklinik. *Retten!* 2020; (9): 352–361

17. Falk E. Pathogenesis of atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology*; 2006; Apr 18;47(8 Suppl): C7-12; DOI: 10.1016/j.jacc.2005.09.068

18. Emini Veseli B., Perrotta P., De Meyer GRA., Roth L., Van der Donckt C., Martinet W., De Meyer GRY. Animal models of atherosclerosis. *European Journal of Pharmacology*; 2017; Dec 5;816: 3–13; DOI: 10.1016/j.ejphar.2017.05.010

19. Frangogiannis NG. Pathophysiology of Myocardial Infarction. *Comprehensive Physiology*; 2015; Sep 20;5(4): 1841–1875; DOI: 10.1002/cphy.c150006

20. Gerd Herold und Mitarbeiter. Innere Medizin 2017; ISBN: 978-3-9814660-6-5
21. Koch K. MONICA-Projekt: Eine Todesursache ändert ihren Charakter. Deutsches Ärzteblatt 2000; 97 (10): A583-A584
22. Keil U. Das weltweite WHO-MONICA-Projekt: Ergebnisse und Ausblick. Gesundheitswesen 2005; 67 Sonderheft 1: 38–45; DOI: 10.1055/s-2005-858240
23. WHO MONICA Project Principal Investigators. The World Health Organization MONICA Project (monitoring trends and determinants in cardiovascular disease): a major international collaboration. Journal of Clinical Epidemiology; DOI: 10.1016/0895-4356(88)90084-4
24. Frantz, S., Hundertmark, M. J., Schulz-Menger, J., Bengel, F. M., Bauersachs, J. Left ventricular remodelling post-myocardial infarction: pathophysiology, imaging, and novel therapies. Eur Heart J; 2022; 27: 2549–2561; DOI: 10.1093/eurheartj/ehac223
25. Evers, A. S.; Murphree, S.; Saffitz, J. E.; Jakschik, B. A.; Needleman, P. Effects of endogenously produced leukotrienes, thromboxane, and prostaglandins on coronary vascular resistance in rabbit myocardial infarction. J Clin Invest; 1985; 3: 992–999; DOI: 10.1172/JCI111801
26. Tibaut M, Mekis D, Petrovic D. Pathophysiology of Myocardial Infarction and Acute Management Strategies. Cardiovasc Hematol Agents Med Chem; 2017; 3: 150–159; DOI: 10.2174/1871525714666161216100553
27. Prabhu SD, Frangogiannis NG. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. Circ Res; 2016; 1:91-112; DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.303577
28. Sutton MG, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. Circulation; 2000; 25:2981-2988; DOI: 10.1161/01.cir.101.25.2981
29. Rentrop KP, Feit F. Reperfusion therapy for acute myocardial infarction: Concepts and controversies from inception to acceptance. Am Heart J; 2015; 5:971-981; DOI: 10.1016/j.ahj.2015.08.005

30. Zhang Y, Huo Y. Early reperfusion strategy for acute myocardial infarction: a need for clinical implementation. *J Zhejiang Univ Sci B*; 2011; 8:629-632; DOI: 10.1631/jzus.B1101010
31. Jackson, B. M., Gorman, J. H., Moainie, S. L., Guy, T. S., Narula, N., Narula, J., John-Sutton, M. G., Edmunds, L. H., Gorman, R. C. Extension of borderzone myocardium in postinfarction dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*; 2002; 6:1160-7; discussion 1168-71; DOI: 10.1016/s0735-1097(02)02121-6
32. Shimkunas, R., Makwana, O., Spaulding, K., Bazargan, M., Khazalpour, M., Takaba, K., Soleimani, M., Myagmar, B.E., Lovett, D. H., Simpson, P. C., Ratcliffe, M. B., Baker, A. J.. Myofilament dysfunction contributes to impaired myocardial contraction in the infarct border zone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 2014; 8:H1150-8; DOI: 10.1152/ajpheart.00463.2014
33. Kramer, C. M.; Lima, J. A.; Reichek, N.; Ferrari, V. A.; Llaneras, M. R.; Palmon, L. C.; Yeh, I. T.; Tallant, B.; Axel, L. Regional differences in function within noninfarcted myocardium during left ventricular remodeling. *Circulation*; 1993; 3:1279-1288; DOI: 10.1161/01.cir.88.3.1279
34. Carberry J, Carrick D, Haig C et al. Remote Zone Extracellular Volume and Left Ventricular Remodeling in Survivors of ST-Elevation Myocardial Infarction. *Hypertension*; 2016, 2:385-391; DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07222
35. Cheng, R., Wei, G., Yu, L., Su, Z., Wei, L., Bai, X., Tian, J., Li, X. Coronary flow reserve in the remote myocardium predicts left ventricular remodeling following acute myocardial infarction. *Yonsei Med J*; 2014; 4:904-911; DOI: 10.3349/ymj.2014.55.4.904
36. Kronenbitter, A., Funk, F., Hackert, K., Gorreßen, S., Glaser, D., Boknik, P., Poschmann, G., Stühler, K., Isić, M., Krüger, M., Schmitt, J. P. Impaired Ca²⁺ cycling of nonischemic myocytes contributes to sarcomere dysfunction early after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*; 2018; 119:28-39; DOI: 10.1016/j.yjmcc.2018.04.004
37. Korovesis TG, Koutrolou-Sotiropoulou P, Katritsis DG. Arrhythmogenic Mitral Valve Prolapse. *Arrhythm Electrophysiol Rev*; 2022; e16; DOI: 10.15420/aer.2021.28

38. Ostrowski, S. R., Pedersen, S. H., Jensen, J. S., Mogelvang, R., Johansson, P.
Acute myocardial infarction is associated with endothelial glycocalyx and cell damage and a parallel increase in circulating catecholamines. *Crit Care*; 2013; 1:R32; DOI: 10.1186/cc12532
39. Horn F. *Biochemie des Menschen*. 4., aktualisierte und erweiterte Auflage: Georg Thieme Verlag KG Stuttgart - New York, 2009. ISBN: 978-3-13-130884-9
40. Hort W. Struktur- und Funktionsdynamik des Myokard. In: Doerr W, Seifert G, Chuaqui B, et al., editors. *Pathologische Anatomie des Herzens und seiner Hüllen. Spezielle pathologische Anatomie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1993: 201–36. ISBN: 978-3-642-51157-8
41. Benninghoff/Drenckhahn, editor. *Anatomie: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie*. 17th ed., Vol 1. München, Jena: Urban & Fischer / Elsevier, 2008. ISBN: 978-3-437-42342-0
42. Helmut Hildebrandt und Mitarbeiter. *Pschyrembel: Klinisches Wörterbuch*. 258., neu bearbeitete Auflage. Berlin, New York: Walter de Gruyter, 1998. ISBN: 3-11-014824-2
43. Klinke/Pape/Kurtz/Silbernagl. *Physiologie*. 6. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG Stuttgart - New York, 2010. ISBN: 978-3-13-796006-5
44. Collinson PO, Boa FG, Gaze DC. Measurement of cardiac troponins. *Ann Clin Biochem* 2001;38(Pt 5):423–49. DOI: 10.1177/000456320103800501
45. Huppelsberg J, Walter K. *Kurzlehrbuch Physiologie*. 3., überarbeitete Auflage: Georg Thieme Verlag KG Stuttgart - New York, 2009. ISBN: 978-3-13-136433-3
46. Sakata T, Watanabe S, Mazurek R, et al. Impaired Diastolic Function Predicts Improved Ischemic Myocardial Flow by Mechanical Left Ventricular Unloading in a Swine Model of Ischemic Heart Failure. *Front Cardiovasc Med* 2021;8:795322. DOI: 10.3389/fcvm.2021.795322
47. Heeg E, Reuter N, Haller U, Sunder-Plassmann U. Größe und Zeitpunkt von dp/dt_{max} unter verschiedenen hämodynamischen Bedingungen. In: Thauer R, Pleschka K, editors. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Kreislaufforschung: Tagung. Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Kreislaufforschung*. Darmstadt: Steinkopff, 1971: 164–70. DOI: 10.1007/978-3-642-72303-2_16
48. Schmidt et al. *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie*. 31.th ed.: Springer-Verlag, 2010. ISBN: 978-3-642-01651-6

49. Brandes R, Lang F, Schmidt RF, editors. Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie. 32nd ed. Springer-Lehrbuch. Berlin: Springer, 2020. ISBN: 978-3662564677
50. Singh D, Akingbola A, Ross-Ascuitto N, Ascuitto R. Electrocardiac effects associated with lithium toxicity in children: an illustrative case and review of the pathophysiology. *Cardiol Young* 2016;26(2):221–9. DOI: 10.1017/S104795111500147X
51. Qu Z, Yan D, Song Z. Modeling Calcium Cycling in the Heart: Progress, Pitfalls, and Challenges; 2022; DOI: 10.3390/biom12111686
52. Griffin PP, Schubert-Zsilavecz M, Stark H. Hemmstoffe von Beta-Adrenozeptoren: Gemeinsamkeiten und Unterschiede. *Pharmazie in unserer Zeit*; 2004; 6: 442–449; DOI: 10.1002/pauz.200400091
53. Lugin, J., Parapanov, R., Krueger, T., Liaudet, L. Murine Myocardial Infarction Model using Permanent Ligation of Left Anterior Descending Coronary Artery. *J Vis Exp*; 2019; 150; DOI: 10.3791/59591
54. Muthuramu, I., Lox, M., Jacobs, F., de Geest, B. Permanent ligation of the left anterior descending coronary artery in mice: a model of post-myocardial infarction remodelling and heart failure. *J Vis Exp*; 2014; 94; DOI: 10.3791/52206
55. Johny E, Dutta P. Left Coronary Artery Ligation: A Surgical Murine Model of Myocardial Infarction. *J Vis Exp*; 2022; 168; DOI: 10.3791/64387
56. Johns TNP, Olson BJ. Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals. *Ann Surg*; 1954; 5:675-682; DOI: 10.1097/0000658-195411000-00006
57. Kim, S-C., Boehm, O., Meyer, R., Hoeft, A., Knüfermann, P., Baumgarten, G. A murine closed-chest model of myocardial ischemia and reperfusion. *J Vis Exp*; 2012; 65:e3896; DOI: 10.3791/3896
58. Kalogeris, T., Baines, C. P., Krenz, M., Korthuis, R. J. Ischemia/Reperfusion. *Comprehensive Physiology*; 2016; 1:113-170; DOI: 10.1002/cphy.c160006

59. Hartman, M. H. T., Vreeswijk-Baudoin, I., Groot, H. E., van de Kolk, K. W. A., Boer, R. A. de, Mateo Leach, I., Vliegthart, R., Sillje, H. H. W., van der Harst, P. Inhibition of Interleukin-6 Receptor in a Murine Model of Myocardial Ischemia-Reperfusion. *PLoS One*; 2016; 12:e0167195; DOI: 10.1371/journal.pone.0167195
60. Klocke, R., Tian, W., Kuhlmann, M. T.; Nikol, S. Surgical animal models of heart failure related to coronary heart disease. *Cardiovasc Res*; 2007; 1:29-38; DOI: 10.1016/j.cardiores.2006.11.026
61. Reffelmann, T., Hale, S. L., Li, G., Kloner, R. A. Relationship between no reflow and infarct size as influenced by the duration of ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 2002; 2:H766-72; DOI: 10.1152/ajpheart.00767.2001
62. Neckář, J.; Ošťádal, B.; Kolář, F. Acute but not chronic tempol treatment increases ischemic and reperfusion ventricular arrhythmias in open-chest rats. *Physiol Res*; 2008; 4:653-656; DOI: 10.33549/physiolres.931537
63. Oyama, Y., Blaskowsky, J., Eckle, T. Dose-dependent Effects of Esmolol-epinephrine Combination Therapy in Myocardial Ischemia and Reperfusion Injury. *Current Pharmaceutical Design*; 2019; 19:2199-2206; DOI: 10.2174/1381612825666190618124829
64. Bartman, C. M., Oyama, Y., Brodsky, K., Khailova, L., Walker, L., Koeppen, M., Eckle, T. Cardiac Per2 functions as novel link between fatty acid metabolism and myocardial inflammation during ischemia and reperfusion injury of the heart. *PLoS One*; 2013; 8:e71493; DOI: 10.1371/journal.pone.0071493
65. Bartman, C. M., Oyama, Y., Brodsky, K., Khailova, L., Walker, L., Koeppen, M., Eckle, T. Intense light-elicited upregulation of miR-21 facilitates glycolysis and cardioprotection through Per2-dependent mechanisms. *PLoS One*; 2017; 4:e0176243; DOI: 10.1371/journal.pone.0176243
66. Nossuli, T. O.; Lakshminarayanan, V.; Baumgarten, G.; Taffet, G. E.; Ballantyne, C. M.; Michael, L. H.; Entman, M. L. A chronic mouse model of myocardial ischemia-reperfusion: essential in cytokine studies. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 2000; 4: H1049-55; DOI: 10.1152/ajpheart.2000.278.4.H1049

67. Freyholdt, T., Massoudy, P., Zahler, S., Henze, R., Barankay, A., Becker, B. F., Meisner, H. Beneficial effect of sodium nitroprusside after coronary artery bypass surgery: pump function correlates inversely with cardiac release of proinflammatory cytokines. *J Cardiovasc Pharmacol*; 2003; 3:372-378; DOI: 10.1097/00005344-200309000-00008
68. Ge, X., Meng, Q., Wei, L., Liu, J., Li, M., Liang, X., Lin, F., Zhang, Y., Li, Y., Liu, Z., Fan, H., Zhou, X. Myocardial ischemia-reperfusion induced cardiac extracellular vesicles harbour proinflammatory features and aggravate heart injury. *J Extracell Vesicles*; 2021, 4:e12072; DOI: 10.1002/jev2.12072
69. Suleiman, M-S; Zacharowski, K.; Angelini, G. D. Inflammatory response and cardioprotection during open-heart surgery: the importance of anaesthetics. *Br J Pharmacol*; 2008; 1:21-33; DOI: 10.1038/sj.bjp.0707526
70. Ong, S.-B., Hernández-Reséndiz, S., Crespo-Avilan, G. E., Mukhametshina, R. T., Kwek, X.-Y., Cabrera-Fuentes, H. A., Hausenloy, D. J. Inflammation following acute myocardial infarction: Multiple players, dynamic roles, and novel therapeutic opportunities. *Pharmacol Ther*; 2018; 73-87; DOI: 10.1016/j.pharmthera.2018.01.001
71. Cain, B. S., Meldrum, D. R., Meng, X., Shames, B. D., Banerjee, A., Harken, A. H. Calcium preconditioning in human myocardium. *Ann Thorac Surg*; 198; 4:1065-1070; DOI: 10.1016/s0003-4975(98)00093-9
72. Kunecki, M., Płazak, W., Roleder, T., Biernat, J., Oleksy, T., Podolec, P., Gołba, K. S. 'Opioidergic postconditioning' of heart muscle during ischemia/reperfusion injury. *Cardiol J*; 2017; 4:419-426; DOI: 10.5603/CJ.a2016.0090
73. Mouton AJ, Rivera OJ, Lindsey ML. Myocardial infarction remodeling that progresses to heart failure: a signaling misunderstanding. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 2018; 1:H71-H79; DOI: 10.1152/ajpheart.00131.2018
74. Pfeffer M. A., Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation*; 1990; Apr;81(4) // 4: 1161–1172; DOI: 10.1161/01.cir.81.4.1161

75. Pulido, M., Pedro, M. Á., de; Álvarez, V., Marchena, A. M., Blanco-Blázquez, V., Báez-Díaz, C., Crisóstomo, V., Casado, J. G., Sánchez-Margallo, F. M., López, E. Transcriptome Profile Reveals Differences between Remote and Ischemic Myocardium after Acute Myocardial Infarction in a Swine Model. *Biology (Basel)*; 2023; 3; DOI: 10.3390/biology12030340
76. LEIFiphysik. LEIFiphysik. Hamburg. Im Internet: www.leifiphysik.de; Stand: 14.06.2023
77. Cochrane, A. D., Pathik, S., Smolich, J. J., Conyers, R. A., Rosenfeldt, F. L. Depressed function in remote myocardium after myocardial infarction: influence of orotic acid. *Ann Thorac Surg*; 1996; 6:1765-1772; DOI: 10.1016/s0003-4975(96)00673-x
78. Mendiola, E. A., Neelakantan, S., Xiang, Q., Merchant, S., Li, K., Hsu, E. W., Dixon, R. A. F., Vanderslice, P., Avazmohammadi, R. Contractile Adaptation of the Left Ventricle Post-myocardial Infarction: Predictions by Rodent-Specific Computational Modeling. *Ann Biomed Eng*; 2023; 4:846-863; DOI: 10.1007/s10439-022-03102-z
79. Bahit MC, Kochar A, Granger CB. Post-Myocardial Infarction Heart Failure. *JACC Heart Fail*; 2018; 3:179-186; DOI: 10.1016/j.jchf.2017.09.015
80. Jenča, D., Melenovský, V., Stehlik, J., Staněk, V., Kettner, J., Kautzner, J., Adámková, V., Wohlfahrt, P. Heart failure after myocardial infarction: incidence and predictors. *ESC Heart Fail*; 2021; 1:222-237; DOI: 10.1002/ehf2.13144
81. Duncker, D. J., Boontje, N. M., Merkus, D., Versteilen, A., Krysiak, J., Mearini, G., El-Armouche, A., Beer, V. J. de, Lamers, J. M. J., Carrier, L., Walker, L. A., Linke, W. A., Stienen, G. J. M.; van der Velden, J. Prevention of myofilament dysfunction by beta-blocker therapy in postinfarct remodeling. *Circ Heart Fail*; 2009; 3:233-242; DOI: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.108.806125
82. Cao, J. M.; Chen, L. S.; KenKnight, B. H.; Ohara, T.; Lee, M. H.; Tsai, J.; Lai, W. W.; Karagueuzian, H. S.; Wolf, P. L.; Fishbein, M. C.; Chen, P. S. Nerve sprouting and sudden cardiac death. *Circ Res*; 2000; 7:816-821; DOI: 10.1161/01.res.86.7.816

83. Talukder, M. A. H., Kalyanasundaram, A., Zhao, X., Zuo, L., Bhupathy, P., Babu, G. J., Cardounel, A. J., Periasamy, M., Zweier, J. L. Expression of SERCA isoform with faster Ca²⁺ transport properties improves postischemic cardiac function and Ca²⁺ handling and decreases myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 2007; 4:H2418-28; DOI: 10.1152/ajpheart.00663.2007
84. Opie LH. The mechanism of myocyte death in ischaemia. *Eur Heart J*; 1993; 31-33; DOI: 10.1093/eurheartj/14.suppl_g.31
85. Opie L.H., Clusin W.T. Cellular mechanism for ischemic ventricular arrhythmias. *Annu Rev Med*; 1990; 231-238; DOI: 10.1146/annurev.me.41.020190.001311
86. Misra, M. K., Sarwat, M., Bhakuni, P., Tuteja, R., Tuteja, N. Oxidative stress and ischemic myocardial syndromes. *Med Sci Monit* 2009; 15 (10): RA209-219
87. Sen, L., Cui, G., Fonarow, G. C., Laks, H. Differences in mechanisms of SR dysfunction in ischemic vs. idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 2000; 2:H709-18; DOI: 10.1152/ajpheart.2000.279.2.H709
88. Freemantle, N., Cleland, J., Young, P., Mason, J., Harrison, J. beta Blockade after myocardial infarction: systematic review and meta regression analysis. *BMJ*; 1999; 7200:1730-1737; DOI: 10.1136/bmj.318.7200.1730
89. Smith, S. C., Blair, S. N., Bonow, R. O., Brass, L. M., Cerqueira, M. D., Dracup, K., Fuster, V., Gotto, A., Grundy, S. M., Miller, N. H., Jacobs, A., Jones, D., Krauss, R. M., Mosca, L., Ockene, I., Pasternak, R. C., Pearson, T., Pfeffer, M. A., Starke, R. D., Taubert, K. A. AHA/ACC Guidelines for Preventing Heart Attack and Death in Patients With Atherosclerotic Cardiovascular Disease: 2001 update. A statement for healthcare professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology. *J Am Coll Cardiol*; 2001; 5:1581-1583; DOI: 10.1016/s0735-1097(01)01682-5
90. Lipskaia L, Keuylian Z, Blirando K, et al. Expression of sarco (endo) plasmic reticulum calcium ATPase (SERCA) system in normal mouse cardiovascular tissues, heart failure and atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta* 2014;1843(11):2705–18. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2014.08.002
91. Prunier, F., Chen, Y., Gellen, B., Heimburger, M., Choqueux, C., Escoubet, B., Michel, J.-B., Mercadier, J.-J. Left ventricular SERCA2a gene down-regulation does not parallel ANP gene up-regulation during post-MI remodelling in rats. *Eur J Heart Fail*; 2005; 5:739-747; DOI: 10.1016/j.ejheart.2004.10.007

92. Christia, P., Bujak, M., Gonzalez-Quesada, C., Chen, W., Dobaczewski, M., Reddy, A., Frangogiannis, N. G. Systematic characterization of myocardial inflammation, repair, and remodeling in a mouse model of reperfused myocardial infarction. *J Histochem Cytochem*; 2013; 8:555-570; DOI: 10.1369/0022155413493912
93. Regnault, V., Lagrange, J., Pizard, A., Safar, M. E., Fay, R., Pitt, B., Challande, P., Rossignol, P., Zannad, F., Lacolley, P. Opposite predictive value of pulse pressure and aortic pulse wave velocity on heart failure with reduced left ventricular ejection fraction: insights from an Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study (EPHESUS) substudy. *Hypertension*; 2024; 1:105-111; DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02046
94. Kötter S, Kazmierowska M, Andresen C, et al. Titin-Based Cardiac Myocyte Stiffening Contributes to Early Adaptive Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction. *Circ Res* 2016;119(9):1017–29. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309685
95. Szymanski MW, Singh DP. Isoproterenol [online]. Available from URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526042/> [Accessed 2024 Jul 22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526042/>
96. Arts T, Lyon A, Delhaas T, Kuster DWD, van der Velden J, Lumens J. Translating myosin-binding protein C and titin abnormalities to whole-heart function using a novel calcium-contraction coupling model. *J Mol Cell Cardiol* 2024;190:13–23. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2024.03.001

Danksagung

Ich bedanke mich als erstes bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Joachim Schmitt zur Möglichkeit unter ihm promovieren zu dürfen. Er stand mir jederzeit, über diverse Kommunikationsmöglichkeiten auch in der Distanz während der Pandemie, mit Rat und Tat zur Seite. Die Wege waren kurz und das Verhältnis herzlich kollegial.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Prof. Dr. Jens W. Fischer für die Möglichkeit zur Nutzung des Labors und der dortigen Gerätschaften sowie die Promotionsmöglichkeit an seinem Institut.

Mein Dank gilt ebenfalls meiner Co-Betreuerin Prof. Dr. rer. nat. Martina Krüger für die Übernahme der Betreuung und die konstruktiven Gespräche.

Danken möchte ich auch der gesamten Forschungsgruppe und aller dort involvierten Personen im Rahmen des Forschungsprojektes SFB 1116.

Ein besonderer Dank gilt auch meinen direkten Kollegen der Forschungsgruppe von Prof. Dr. Joachim Schmitt. Frau Annette Kronenbitter für die Paraffin-Einbettung der Papillarmuskeln. Frau Susanne Hölzer für freundschaftliche, konstruktive, motivierende Gespräche. Herrn Florian Funk für die fachliche Expertise und Erfahrungen hinsichtlich statistischen Auswertungen. Frau Katarzyna Hackert für die stete Hilfsbereitschaft.

Mein Dank gilt zudem dem klinischen Kardiologie Labor und den dortigen Kollegen für den konstruktiven Austausch und das zur Verfügungstellen des Rezeptes für die Tyrode-Lösung.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Institutes der Pharmakologie und Toxikologie und die stete Bereitschaft zur fachlichen Expertise.

Meinem Mann, meinen Kindern und engsten Freunden danke ich insbesondere für die unerschütterliche Geduld und Motivation in schwierigen Zeiten ohne die eine Fertigstellung dieser Dissertation nicht möglich gewesen wäre.