Aus der Klinik für Innere Medizin CC11 Schwerpunkt Kardiologie
Center for Cardiovascular Research (CCR)
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Evaluation antianginös wirkender Kanal- und Rezeptorblocker in einem koronaren Arteriogenesemodell der Ratte

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Nadija Güc

aus Berlin

Datum der Promotion: 05.06.2016

INHALTSVERZEICHNIS

1. ABSTRACT **4**

2. EINLEITUNG **6**

2.1. ARTERIOGENESE **6**
2.1.1. DEFINITION 6
2.1.2. MECHANISMEN DER ARTERIOGENESE 7
2.1.3. KORONARE ARTERIOGENESE UND DER "BIOLOGISCHE BYPASS" 8
2.2. KORONARE HERZKRANKHEIT **8**
2.2.1. EPIDEMIOLOGIE, DEFINITION UND ALLGEMEINE BEHANDLUNGSMÖGLICHKEITEN 8
2.2.2. MEDIKAMENTÖSE THERAPIE DER CHRONISCHEN KHK 9
2.3. UNTERSUCHTE MEDIKAMENTENGRUPPEN **10**
2.3.1. BETAREZEPTORENBLOCKER 10
2.3.2. CALCIUMANTAGONISTEN 11
2.3.3. PIPERAZINDERIVATE (RANOLAZIN) 12
2.4. ZIELSETZUNG DER ARBEIT **13**

3. METHODEN **14**

3.1. VERSUCHSTIERE UND TIERVERSUCHSANTRAG **14**
3.2. REPETITIV-OKKLUSIVES TIERMODELL **14**
3.2.1. INITIALOPERATION 15
3.2.1.1. Narkose und Vorbereitung 15
3.2.1.2. Operativer Eingriff 15
3.2.2. REPETITIV-OKKLUSIVES PROTOKOLL (ROP) 16
3.2.2.1. Pneumatischer Mini-Okkluder 17
3.2.2.2. Kontrolle der Katheterlage 18
3.2.3. FINALOPERATION 19
3.3. VERSUCHSGRUPPEN/STUDIENDESIGN **19**
3.4. BEHANDLUNG DER TIERE **20**
3.4.1. ALLGEMEINE BEHANDLUNG 20
3.4.2. NICHT-MEDIKAMENTÖSE UND MEDIKAMENTÖSE BEHANDLUNG 21
3.4.2.1. Metoprolol 21
3.4.2.2. Verapamil 21
3.4.2.3. Ranolazin 22
3.5. INFARKTVOLUMINA **22**
3.5.1. TIERZAHLEN 22
3.5.2. TTC-FÄRBUNG 22
3.5.3. AUSWERTUNGSTECHNIK 23
3.6. ELEKTROKARDIOGRAPHISCHE DATEN **23**
3.6.1. HERZFREQUENZEN 24
3.6.2. MAXIMALE ST-HEBUNGEN 24
3.6.3. R-AMPLITUDENVERLUSTE 24
3.6.4. HERZRHYTHMUSSTÖRUNGEN 25
3.7. HISTOMORPHOLOGISCHE DATEN **26**
3.7.1. TIERMATERIAL UND VORBEREITUNG 26
3.7.2. KRYO-EINBETTTECHNIK UND SCHNITTANFERTIGUNG 26
3.7.3. IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG 27
3.8. STATISTISCHE AUSWERTUNG **28**
3.9. MATERIALAUFLISTUNG **29**

4. ERGEBNISSE **30**

4.1. GEWICHTE **30**
4.1.1. GEWICHTSVERLAUF 30
4.1.2. DURCHSCHNITTLICHE GRUPPENGEWICHTE 31
4.2. INFARKTVOLUMINA **32**
4.2.1. FÄRBUNG UND DURCHSCHNITTLICHE INFARKTGRÖßE 32
4.2.2. MÖGLICHE EINFLUSSFAKTOREN AUF DIE INFARKTVOLUMINA 34
4.3. EKG-DATEN **34**
4.3.1. HERZFREQUENZABNAHME 34
4.3.2. MAXIMALE ST-HEBUNG UND ST-STRECKENVERÄNDERUNG 35
4.3.3. R-AMPLITUDENVERLUST VOM AUSGANGSWERT 36
4.3.4. HERZRHYTHMUSSTÖRUNGEN 37
4.4. IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG **38**

5. DISKUSSION **40**

5.1. REPETITIV-OKKLUSIVES MODELL DER RATTE **40**
5.1.1. LIMITATION DES ROP 41
5.1.2. FINALOPERATION UND INFARKTBESTIMMUNG 41
5.2. EINFLUSSFAKTOREN AUF DIE INFARKTVOLUMINA **43**
5.3. IMMUNHISTOLOGIE **43**
5.4. MEDIKAMENTEN-EVALUATION **45**
5.4.2. METOPROLOL 45
5.4.2.1. Infarktvolumen 45
5.4.2.2. EKG-Daten 47
5.4.2.2.1. Herzfrequenz 47
5.4.2.2.2. R-Amplitudenverlust 47
5.4.2.2.3. ST-Streckenhebung 47
5.4.2.2.4. Herzrhythmusstörungen 48
5.4.3. VERAPAMIL 50
5.4.3.1. Infarktvolumen 50
5.4.3.2. EKG-Daten 51
5.4.3.2.1. Herzfrequenz 51
5.4.3.2.2. R-Amplitudenverlust 52
5.4.3.2.3. ST-Hebung 52
5.4.3.2.4. Herzrhythmusstörungen 53
5.4.1. RANOLAZIN 54
5.4.1.1. Infarktvolumen 54
5.4.1.2. EKG-Daten 55
5.4.1.2.1. Herzfrequenz 55
5.4.1.2.2. R-Amplitudenverlust 55
5.4.1.2.3. ST-Streckenhebung 56
5.4.1.2.4. Herzrhythmusstörungen 57

6. LITERATURVERZEICHNIS **58**

7. ANHANG **71**

7.1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS **71**
7.2. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG **73**
7.3. CURRICULUM VITAE **74**
7.4. DANKSAGUNG **76**

1. ABSTRACT

Zielsetzung: Ziel der Arbeit war es die, bereits in reinen Infarkt-und Infarkt-Reperfusionsmodellen untersuchte, kardioprotektive Wirkung von antianginös wirkenden Kanal-und Rezeptorblockern erstmals auch in einem koronaren Arteriogenesemodell der Ratte zu evaluieren.

Methoden: Das repetitiv-okklusive Modell fand Anwendung in 32 männlichen Sprague-Dawley-Ratten. Die Tiere wurden zunächst in 5 Gruppen eingeteilt: repetitiv-okklusives Protokoll (ROP), SHAM (Kontrollgruppe), ROP + Metoprolol (METO: 250mg/kg/d p.o.), ROP + Verapamil (VERA: 7,5mg/kg/d p.o.), und ROP + Ranolazin (RANO: 47mg/kg/d p.o.). Allen Tieren wurde in einer Initialoperation ein pneumatischer Miniokkluder auf die Left anterior descending artery (LAD) implantiert. Die Gruppen mit Ausnahme der SHAM-Gruppe durchliefen anschließend über 10 Tage das ROP. Mit Beginn des Protokolls wurde die erste Medikamentendosis appliziert. Am 12. postoperativen Tag erfolgten die experimentelle Infarktsetzung mittels 90-minütiger Okklusion sowie eine 20-minütige Reperfusionsphase. Zur Evaluation der medikamentösen Wirkung wurden die Infarktgrößen bestimmt, elektrokardiographische Daten ausgewertet und immunhistochemische Färbungen angefertigt.

Ergebnisse: Bei der Analyse der durchschnittlichen Infarktvolumina zeigten alle untersuchten Gruppen ein durchschnittlich größeres Infarktareal (SHAM 15 % ± 3,2 METO 11,3 % ± 7,3, VERA 14,1 % ± 4,5 und RANO 15,6 % ± 8,2) im Vergleich zur ROP-Gruppe (6,9 % ± 3,2). Obwohl die Infarktvolumina der SHAM-und RANO-Gruppe doppelt so groß wie die der ROP-Gruppe ausfielen, waren die Unterschiede statistisch nicht signifikant (SHAM: $p = 0,089$; RANO: $p = 0,062$).

Bei der Auswertung der elektrokardiographischen Daten zeigte die RANO-Gruppe (0,13 mV ± 0,063) eine signifikant höhere ST-Hebung im Vergleich zur ROP-Gruppe (0,055 mV ± 0,033; $p < 0,05$). Trotz höherer ST-Hebungen im Vergleich zur ROP-Gruppe waren die Ergebnisse der SHAM- (0,124 mV ± 0,066) und VERA-Gruppe (0,122 mV ± 0,055) nicht signifikant. Die METO-Gabe hatte keinen Einfluss auf das Ausmaß der ST-Hebung. Bei der Analyse des prozentualen R-Amplitudenverlustes zeigten sowohl die SHAM- (63 % ± 16; $p < 0,05$) als auch die VERA-Gruppe (70 % ± 44; $p < 0,01$) signifikant höhere Werte als die ROP-Gruppe (20 % ± 15). Die anderen Gruppen

zeigten keinen Einfluss auf den R-Amplitudenverlust. Sowohl die VERA- (4 [4/4]; p < 0,01) als auch die RANO- (4 [2,5/4]; p = 0,064) Gruppe zeigten ein häufigeres Auftreten von höhergradigen Herzrhythmusstörungen als die ROP-Gruppe (2 [0,5/3]). In der METO-Gruppe zeigte sich kein Einfluss auf die Herzrhythmusstörungen.
Schlussfolgerung: Für keines der untersuchten Medikamente ließ sich im koronaren Arteriogenesemodell der Ratte eine kardioprotektive Wirkung nachweisen. Insbesondere die Medikamente mit einem Einfluss auf die Calciumhomöostase zeigten die Tendenz zu einem negativen Effekt im repetitiv-okklusiven Modell.

Objective: The objective of this study was to evaluate for the first time the cardio-protective effect of antianginal channel- and receptor-blockers in a rat model of coronary arteriogenesis.
Methods: The repetitive-occlusive model was applied on 32 male Sprague-Dawley rats. First the animals were divided into 5 groups: repetitive-occlusive protocol (ROP), SHAM (control group), ROP + Metoprolol (METO: 250mg/kg/d p.o.), ROP + Verapamil (VERA: 7,5mg/kg/d p.o.), ROP + Ranolazin (RANO: 47mg/kg/d p.o.). In initial surgery a pneumatic minioccluder was implanted on the LAD of each animal. Subsequently each group of animals except for the SHAM-group had to undergo the repetitive-occlusive protocol for ten days. Starting the protocol, the animals were given the first dose of medication. On day twelve postsurgery the experimental infarct was initiated by an occlusion of 90 minutes followed by a phase of reperfusion of 20 minutes. To evaluate the effect of the medicinal substances the infarct size was defined, ECG-data were analysed and immunohistological staining was applied.
Results: Analysis of average infarct volumes showed that compared to ROP-group infarct areas in all other groups were larger. Though the infarct volumes of the SHAM- (15% ± 3,2; p = 0,089) and RANO-group (RANO 15,6 % ± 8,2; p = 0,062) were twice the volume of the ROP-group (6,9 % ± 3,2) the differences were not statistically significant. Evaluation of the electrocardiographic data showed that the RANO-group (0,13 mV ± 0,063) had significantly higher ST-segment elevation than the ROP-group (0,055 mV ± 0,033; p < 0,05). Despite higher ST-segment elevation compared to the ROP-group the results of the SHAM- and VERA-group were not significant. Administration of METO had no impact on the extent of ST-segment elevation. Analysis of the percentage R-amplitude loss resulted in significantly higher loss of the SHAM-

(63 % ± 16; $p < 0,05$) and VERA-group (70 % ± 44; $p < 0,01$) compared to the ROP-group (20 % ± 15). There was no effect on R-amplitude loss in any of the other groups. Both VERA- and RANO-group were more frequently affected by high-grade cardiac arrythmias than the ROP-group. Administration of METO had no effect on cardiac arrythmias.

Conclusion: None of the medication examined showed cardio-protective effect in the rat model of coronary arteriogenesis. Particularly drugs affecting Calcium Homeostasis tended to have negative effects in the repetitive-occlusive model.

2. EINLEITUNG

2.1. ARTERIOGENESE

2.1.1. Definition

Beim Auftreten einer flusslimitierenden Stenose ist die Versorgung des poststenotischen Gewebes abhängig vom Ausmaß des Kollateralblutflusses und damit vom Durchmesser der Kollateralgefäße, sogenannter „biologischer Bypässe“ (1, 2).

Bei den biologischen Bypässen handelt es sich um präexistente Arteriolen, die sich durch einen erhöhten Blutfluss und die hier wirkenden Scherkräfte zu größeren Gefäßen (Arterien) umbauen. Dieser Prozess wird als Arteriogenese bezeichnet (3-5) und gilt im Vergleich zur Vaskulogenese und Angiogenese als das effizienteste Gefäßwachstum, um eine stabile Versorgung des Gewebes nach einem arteriellen Verschluss zu gewährleisten (6).

Physiologisch findet man nur geringe Strömungsgeschwindigkeiten in den Kollateralgefäßen. Kommt es jedoch zu einer Stenose eines benachbarten Gefäßes, ändern sich die Druck- und Strömungsverhältnisse und die Kollateralgefäße werden vermehrt perfundiert (7). Dieser vermehrte Fluss induziert über eine Erhöhung der Scherkräfte das Kollateralgefäßwachstum (4-6, 8) und es kommt zu einer Vergrößerung des Gefäßdurchmessers. Das nachgeschaltete ischämische Gebiet kann über diese entstandene funktionale Konduktanzarterie besser versorgt werden (4, 5).

Physiologisch relevant ist, dass der Arteriogeneseprozess proximal der Stenose stattfindet, d.h. dass er unabhängig vom Auftreten einer Ischämie des betroffenen Gebietes ist (9).

2.1.2. Mechanismen der Arteriogenese

Mechanische Kräfte (pulsatile Scherkräfte) sind die entscheidenden Initiatoren der Arteriogenese (7, 8, 10, 11). Nach dem Hookschen Gesetz führen sie zu einer linearen (proportionalen) Erhöhung der Schubspannung an den Gefäßwänden. Durch die einwirkenden Kräfte kommt es zur Aktivierung des Endothels, welches nun vermehrt chemotaktische Substanzen (12), Rezeptoren für zirkulierende Monozyten und Adhäsionsmoleküle freisetzt bzw. exprimiert (13). Zudem werden verschiedene dehnungssensible Ionenkanäle aktiviert (14). Gleichzeitig wird die Expression der endothelialen Stickstoffsynthase (eNOS) hochreguliert, die zur sog. „Flow-mediated“ Vasodilatation führt und damit eine weitere Erhöhung des Blutflusses innerhalb des Kollateralgefäßes bewirkt (15). Aktuelle Forschungsergebnisse legen nahe, dass die Vasodilatation entscheidend für die Transmigration von Monozyten sein könnte (16). Diese stellen neben den Endothelzellen und glatten Muskelzellen die wichtigsten Effektorzellen der Arteriogenese dar (17-20).
Im Zuge der Arteriogenese wandern Monozyten in den perivaskulären Raum ein und differenzieren dort zu Makrophagen aus. Diese wiederum setzen vermehrt Chemokine wie den Tumornekrosefaktor-α (TNFα) (21), das Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1) (12), sowie Matrixmetalloproteinasen und Wachstumsfaktoren frei (21, 22), wodurch in Folge weitere Monozyten rekrutiert werden. Die Proteasen führen zu einem vermehrten Abbau von Extrazellularmatrix, wodurch Platz für die Zunahme des Kollateralgefäßdurchmessers geschaffen wird (22). Wachstumsfaktoren wie der Transforming Growth Factor-β (TGFβ) bewirken daraufhin eine vermehrte Proliferation der Endothelzellen und spielen eine große Rolle beim „Myokard-Remodelling“ (23). Zudem werden nicht nur die Endothelzellen zur Mitose stimuliert, sondern auch die glatten Muskelzellen zur Proliferation angeregt (4, 24).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass bei der Arteriogenese Reibungskräfte inflammatorische Prozesse initiieren, die dann zu einem aktiven Umbauprozess der Gefäßwand führen.

2.1.3. Koronare Arteriogenese und der “biologische Bypass”

Wie bereits erwähnt, stellt die Arteriogenese den einzigen Gefäßwachstumsprozess dar, durch den es möglich ist poststenotisches/ischämisches Gewebe effizient zu versorgen (6). Die Rolle der koronaren Arteriogenese ist jedoch komplex. Einerseits zeigten Studien bei Patienten mit gut ausgebildetem koronaren Kollateralsystem ein vermehrtes Auftreten von „Steal-Phänomenen“. Im vasodilatierten Zustand kann ein gut ausgebildetes Kollateralsystem demnach zusätzlich zu einem Blutflussabfall in unterversorgten Gebieten führen (25). Zudem ist ein gut ausgebildetes Kollateralsystem mit einem erhöhten Risiko für eine Restenosierung nach perkutaner transluminaler koronarer Angioplastie (PTCA) assoziiert (26).
Andererseits ist bekannt, dass ein gut ausgebildetes koronares Kollateralsystem bei Patienten mit einer koronaren Herzkrankheit (KHK) während eines akuten Herzinfarktes kardioprotektiv sein kann. So fielen bei Patienten mit guter Kollateralisierung das Ausmaß des Laktatdehydrogenase-Anstiegs (27) und die Größe des Infarktes (28, 29) im Vergleich zu Patienten mit schlechter Kollateralisierung geringer aus. Die Patienten zeigten außerdem eine bessere postischämische linksventrikuläre Funktion und bildeten seltener ein linksventrikuläres Aneurysma aus (28). Im Langzeitverlauf traten bei Patienten mit effizientem Kollateralsystem weniger kardiovaskuläre Ereignisse auf (30), wodurch die Gesamtmortalität gesenkt werden konnte (26, 31, 32).

2.2. KORONARE HERZKRANKHEIT

2.2.1. Epidemiologie, Definition und allgemeine Behandlungsmöglichkeiten

Laut Statistischem Bundesamt stellen die koronare Herzkrankheit (KHK) und der akute Myokardinfarkt noch immer die beiden Haupttodesursachen in Deutschland dar (33).

Das grundlegende Problem sind Stenosen infolge arteriosklerotischer Gefäßveränderungen, die zu einer Sauerstoffunterversorgung des nachgeschalteten Gewebes führen und von einem Gewebeuntergang begleitet werden können (34). Klinisch äußert sich die Unterversorgung des Gewebes typischerweise in Form von Angina-pectoris-Anfällen (AP-Anfällen).
Die KHK gliedert sich grob in zwei Gruppen: Akutes Koronarsyndrom oder chronische KHK. Das Akute Koronarsyndrom (ACS) ist ein akut lebensbedrohlicher Zustand, der unterteilt wird in die instabile Angina pectoris (AP), den ST-Hebungsinfarkt (STEMI) und den Nicht-ST-Hebungsinfarkt (NSTEMI) (34). Da sich diese Arbeit mit der Prävention des ACS, d.h. der Behandlungsoptimierung der chronischen KHK beschäftigte, wird im Weiteren nur noch auf die chronische KHK eingegangen.
Zu den Langzeitfolgen der chronischen KHK gehören der Myokardinfarkt, die Herzinsuffizienz und kreislaufrelevante Herzrhythmusstörungen. Dies verdeutlicht, dass Patienten mit chronischer KHK über eine stark verminderte Lebensqualität verfügen und ein erhöhtes Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko aufweisen (34).
Die aktuellen Behandlungsleitlinien der chronischen KHK basieren auf drei großen Säulen, der konservativen/medikamentösen, der interventionellen und der chirurgischen Therapie (34, 35).
Etwa jeder fünfte KHK-Patient mit relevanter Stenose profitiert nicht von einer Revaskularisationstherapie oder hat Risikofaktoren, die gegen einen chirurgischen Eingriff sprechen (36). Bei diesen Patienten könnte, neben der medikamentösen Therapie, ein gut ausgebildetes koronares Kollateralsystem einen entscheidenden Prognosefaktor und eine Therapiealternative darstellen.

2.2.2. Medikamentöse Therapie der chronischen KHK

Grundsätzlich lassen sich die Ziele der konservativen KHK-Behandlung in zwei große Gruppen einteilen: Dazu zählen erstens die Prävention von Langzeitfolgen wie Myokardinfarkt oder Herzinsuffizienz, d.h. Senkung von Mortalität und Morbidität. Zweitens die Prophylaxe von AP-Anfällen und damit eine Steigerung der Lebensqualität (34). Demnach lässt sich auch der Einsatz der medikamentösen Behandlung in eine prognoseverbessernde oder rein symptomatische Therapie unterteilen.

Zu den prognoseverbessernden Therapeutika gehören die Thrombozytenaggregationshemmer (z.B. Acetylsalicylsäure), denen in anderen Studien bereits antiarteriogene Effekte nachgewiesen werden konnte (37, 38). Weiterhin zählen die Lipidsenker (im Besonderen die HMG-CoA-Reduktasehemmer) und die Blutdrucksenker, vor allem die Beta-Blocker, aber auch die Inhibitoren des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (ACE-Hemmer) dazu.
Für die symptomatische Therapie, d.h. zur Prophylaxe von AP-Anfällen, sind ebenso Beta-Blocker, alternativ aber auch langwirksame Calciumantagonisten, If-Kanal-Blocker (Ivabradin) oder Piperazinderivate (Ranolazin) geeignet. Eine Sonderstellung nehmen die Nitrate ein, welche zum Einsatz bei einem akuten AP-Anfall zugelassen sind (34).

In der vorliegenden Arbeit wurde je ein Vertreter der antianginös wirkenden Rezeptor (Beta-Blocker)- bzw. Kanalblocker (Calciumantagonisten und das Piperazinderivat Ranolazin) untersucht.

2.3. UNTERSUCHTE MEDIKAMENTENGRUPPEN

2.3.1. Betarezeptorenblocker

Betarezeptorenblocker können in β1-selektiv, d.h. kardioselektiv und nicht β1-selektiv unterteilt werden. Über die kompetetive Bindung an die Betarezeptoren kann die Katecholaminwirkung sowohl auf das Gefäßsystem, als auch am Herzen reduziert werden. Am Herzen wirken Betablocker über β1-Rezeptoren negativ chronotrop (Senkung der Herzfrequenz), negativ dromotrop (Herabsetzen der Erregungsleitung), negativ inotrop (Senken der Kontraktilität) und negativ bathmotrop (senken der Reizschwelle des Herzens). Durch das Senken der Herzfrequenz wird die Diastole verlängert (39). Für niedrige Herzfrequenzen konnte eine verbesserte Koronarperfusion durch eine verlängerte Diastole nachgewiesen werden. Die verstärkte Durchblutung der Koronargefäße führt wiederum zu vermehrten Scherkräften am Endothel (40).
Die kardioprotektive Betablockerwirkung beruht auf der Senkung des kardialen Sauerstoffbedarfs und einer Erhöhung des Sauerstoffangebotes (34). Dadurch reduzieren Betablocker bei KHK-Patienten mit arterieller Hypertonie (41, 42) und nach einem Herzinfarkt (43) die Morbidität und Mortalität. Da Betablocker nicht nur

prognoseverbessernde Wirkung aufweisen, sondern auch zur Prophylaxe von AP-Anfällen geeignet sind, werden sie als Mittel der ersten Wahl bei stabiler KHK und arterieller Hypertonie empfohlen (34).
Als Standardpräparat mit weiter Verbreitung wurde hier der kardioselektive β1-Blocker Metoprolol untersucht, der laut Leitlinien 2014 alle oben genannten Eigenschaften aufweist (34).

2.3.2. Calciumantagonisten

Derzeit gibt es drei Gruppen von Kalziumantagonisten auf dem Markt:
Erstens die Gruppe der Dihydropyridine, die über L-Typ-Calcium-Kanäle besonders gefäßselektiv wirken (44). Als zweites die Gruppe der Phenylalkylamine, die v.a. an den T-Typ-Kanälen wirksam werden und damit als besonders kardioselektiv einzustufen sind. Als dritte Gruppe existieren derzeit die Benzothiazepine, die sowohl im Gefäßsystem als auch am Herzen wirken (44).
Calciumantagonisten bedingen eine arterielle Vasodilation (L-Typ-Kanäle) und damit verbunden eine Senkung der Nachlast und eine negative Inotropie. Außerdem kommt es unter der Therapie zu einer Senkung der Herzfrequenz und damit einer Verlängerung der Diastole und verbesserten Koronardurchblutung. Demnach senken auch Calciumantagonisten den kardialen Sauerstoffverbrauch und erhöhen das Sauerstoffangebot (44). Zu den allgemeinen Anwendungsgebieten zählen die arterielle Hypertonie, aber auch die symptomatische Behandlung von AP-Anfällen sowie die Behandlung von Herzrhythmusstörungen (ventrikuläre Tachykardien). Sie werden als Mittel der zweiten Wahl bei Betablocker-Unverträglichkeit oder Versagen einer Betablocker-Therapie empfohlen (34).
Aufgrund ihrer spezifischen Herzwirksamkeit wurde in der vorliegenden Arbeit die Gruppe der Phenylalkylamine untersucht. Typischer Vertreter dieser Medikamentengruppe ist Verapamil, welches zu den langwirksamen Calciumantagonisten gezählt wird. Verapamil entfaltet seine Wirkung vor allem am Myokard und Erregungsbildungs- und –leitungssystem und bewirkt eine leichte arterielle Vasodilatation (44).

2.3.3. Piperazinderivate (Ranolazin)

Laut Leitlinien 2014 ähneln Piperazinderivate in ihrer Wirkung den Calciumantagonisten. Unterschiede bestehen darin, dass sie nicht nur keinen Einfluss auf den Blutdruck und die Herzfrequenz haben, sondern auch keinen Einfluss auf den Koronargefäßtonus aufweisen. Sie können als Reservemittel zur Therapie der AP bei Unverträglichkeit der Betablocker-Therapie oder als Kombinationspräparat bei nicht ausreichender antianginöser Betablockerwirkung angewendet werden (34).

Es gibt zwei Theorien zur Wirkung von Ranolazin am ischämischen Herzen:

Einerseits soll Ranolazin den Stoffwechsel ischämischer Myozyten positiv beeinflussen. Unter Ranolazin erfolge zur Energiegewinnung der ischämischen Zelle vermehrt die Oxidation von Glukose anstelle der ß-Oxidation von freien Fettsäuren, so dass sowohl die Laktatbildung als auch der Sauerstoffverbrauch gesenkt werden könnten (45). Andererseits soll Ranolazin über die Hemmung des späten Natriumeinstroms in die Herzzellen die intrazelluläre Akkumulation von Natriumionen vermindern (46). Die dafür verantwortlichen Kanäle können durch ischämische Metabolite und durch bei der Reperfusion freigesetzte Sauerstoffradikale aktiviert werden (47). Diese Kanäle sind demnach vermehrt aktiv in ischämischen Myozyten (48).

Die intrazelluläre Natriumakkumulation würde normalerweise über eine erhöhte Aktivität des Natrium-Calcium-Antiporters eine intrazelluläre Calciumüberladung (sog. Calicium-Overload) bedingen (46, 49).

Eine Calciumüberladung der ischämischen Myozyten führe zu einer vermehrten mikrovaskulären Kompression, einer erhöhten diastolischen Ventrikelspannung und dem vermehrten Auftreten von Herzrhythmusstörungen. Dies wiederum bedinge eine verminderte Mikrozirkulation und einen erhöhten Sauerstoffverbrauch des ischämischen Herzens (49, 50).

2.4. ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass ein gut ausgebildetes koronares Kollateralsystem bei KHK-Patienten mit relevanter Stenose einen entscheidenden Prognosefaktor im akuten Infarktgeschehen und eine mögliche Therapiealternative darstellt.

Die medikamentöse Therapie stellt neben der Revaskularisatonstherapie einen Grundbaustein in der Therapie der koronaren Herzkrankheit dar. Betablocker, Calciumantagonisten und Piperazinderivate sind in der KHK-Therapie häufig verwendete Medikamentengruppen.

Die kardioprotektive Wirkung der genannten Medikamentengruppen während des akuten Infarktgeschehens wurde in der Vergangenheit sowohl in reinen Infarkt- als auch Infarkt-Reperfusionsmodellen ausreichend untersucht. So zeigten Betablocker (51, 52), Calciumantagonisten (53-55) und Piperazinderivate (56, 57) im akuten Infarktgeschehen eine kardioprotektive Wirkung. Die Wirkung der drei Medikamentengruppen wurde bisher noch nicht in einem koronaren Arteriogenesemodell untersucht. Die medikamentöse Wirkung auf die koronare Arteriogenese könnte einen entscheidenden Prognosefaktor im KHK-Patienten darstellen, so dass der protektive Effekt in einem repetitiv-okklusiven Modell der Ratte anhand der Infarktgröße und elektrokardiographischer Parameter (R-Amplitudenverlust, maximale ST-Hebung, Grad der auftretenden Herzrhythmusstörungen) überprüft werden sollte.

Ziel der Arbeit war es also die, bereits in reinen Infarkt-und Infarkt-Reperfusionsmodellen untersuchte, kardioprotektive Wirkung von antianginös wirkenden Rezeptor- und Kanalblockern erstmals auch in einem koronaren Arteriogenesemodell der Ratte zu evaluieren.

3. METHODEN

3.1. VERSUCHSTIERE UND TIERVERSUCHSANTRAG

Für die Versuche wurde mit männlichen, 10 bis 12 Wochen alten Sprague-Dawley-Ratten gearbeitet. Alle Tiere stammten aus der Zucht der Harlan-Winkelmann GmbH, Borchen, Deutschland und wurden in der Tierhaltung des Center for Cardiovascular Research (CCR) der Charité Universitätsmedizin Berlin gehalten.
Sowohl die Tierhaltung als auch die Tierversuche erfolgten nach den Vorgaben des Tierschutzgesetzes (TierSchG) in seiner jeweils gültigen Fassung. Die Versuche wurden nach § 8 TierSchG vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin unter den Registriernummern G 0387/10 am 18.05.2011 und G 0040/14 am 21.07.2014 genehmigt.

3.2. REPETITIV-OKKLUSIVES TIERMODELL

Das Modell der repetitiven Okklusion nach Prof. W. Chilian vom Northeastern Ohio Universities Colleges of Medicine and Pharmacy (NEOMED) in den USA, hat Anwendung in der Sprague-Dawley-Ratte gefunden (58-62). In dem Modell wird der Ramus interventricularis anterior (LAD) der linken Herzkranzarterie repetitiv verschlossen. Das Modell diente hier zur Induktion koronarer Arteriogenese.
Dafür wurde in einer Initialoperation ein pneumatischer Miniokkluder auf die LAD implantiert. Anschließend wurde für 5 bzw. 10 Tage das computergesteuerte repetitiv-okklusive Protokoll (ROP) gestartet. Dabei wurde, ohne einen Infarkt auszulösen, die LAD in standardisierten Abständen für 40 sec verschlossen.
Bei der Finaloperation schloß sich nach einer experimentellen Infarktsetzung mittels 90-minütiger Okklusion eine 20-minütige Reperfusionsphase an.
Danach erfolgten Organentnahme und Messungen zu den Endpunkten.

3.2.1. Initialoperation

3.2.1.1. Narkose und Vorbereitung

Zusätzlich zur intraoperativen Analgesie mit 0,05 mg/kg Buprenorphin *(Temgesic® 0,3mg/ml, Schering-Plough)* erhielten die Tiere 10 Minuten vor der Operation als Prämedikation Ketamin 100 mg/kg *(Ketavet® 100mg/ml, Pfizer/Pharmacia GmbH)* plus Xylazin 4mg/kg *(Rompun® 2%, Bayer Vital GmbH)* und Atropin 0,04mg/kg KG i.p. *(Atropinsulfat 0,5mg/ml, B.Braun Melsungen AG).* Die Tiere wurden dann bis zum Wirkeintritt der Prämedikation in einen abgedunkelten Einzelkäfig gesetzt.
Nachdem, anhand von erloschenem Lidreflex und Erschlaffung des Muskeltonus, die ausreichende Narkosetiefe festgestellt wurde, erfolgte die orale Intubation *(14-GA, 5 1/4 in.,IV Catheter, ANGIOCATH, Becton Dickison & Co)* mittels Otoskop *(HEINE mini 2000,HEINE Optotechnik)*. Danach wurden die Tiere an die Beatmungsmaschine *(Anaesthesia Work Station, Model:AWS,Serial No.0319, Hallowell EMC, Pittsfield/USA)* angeschlossen. Es erfolgte die Einleitung und Aufrechterhaltung der Vollnarkose mithilfe eines Isofluran-Inhalationsgemisches *(1,0% bis 2,0% Isofluran, mit 100% Sauerstoff).* Die Tiere wurden anschließend auf den Rücken gedreht, an den Vorder- und Hinterläufen mit Gummischlaufen fixiert, die Operationsfläche freigeschoren und desinfiziert.
Zur intraoperativen Überwachung wurden EKG-Elektroden *(PowerLab® 4/30,ADInstruments Ltd.)* sowie ein Thermometer angebracht. Um Temperaturschwankungen zu verhindern, wurde die Körpertemperatur der Tiere mittels elektrischer Wärmeplatte *(Haustechnik, Charité Universitätsmedizin)* und externer Rotlichtlampe *(Philips Infrared R95E, Philips Deutschland GmbH)* auf ca. 37 ± 1° C gehalten.

3.2.1.2. Operativer Eingriff

Zunächst erfolgte die linksseitige Thorakotomie zur Freilegung des Herzens durch eine kleine Inzision im 5. bis 6. Interkostalraum. Sobald direkte Sicht auf das schlagende Herz bestand, wurde ein flexibler Ballonkatheter *(DocXS™Silicone Vascular Occluder, VO-1.5F, Flat, 4,5mm × 8mm, 15mm cuff thickness, DOCXS Biomedical Products and Accessories)* auf Höhe der LAD an der Herzwand fixiert.

Im nächsten Schritt wurde die Lage des Okkluders durch eine 50-sekündige Balloninflation mit 0,7 ml Luft überprüft. Bei korrekter Katheter-Lage zeigten sich ST-Streckenveränderungen im EKG und das farbliche Abblassen des linken Ventrikels (58).
Daraufhin wurde der Burstkorb unter positivem end-expiratorischen Druck wieder verschlossen und die Brusthöhle luftevakuiert. Die Tiere wurden auf den Bauch gedreht und der Katheter, der subkutan verläuft, zwischen den Schulterblättern nach außen geführt. Anschließend wurde der Katheter in eine Sprungfeder eingeführt. Mit einem Plastikring wurde sie subkutan zwischen den Schulterblättern angebracht. Dadurch war der Katheter nach außen zwar geschützt, blieb aber flexibel.
Anschließend wurden die Tiere in die Käfige gesetzt und bis 2 Stunden postoperativ beobachtet. Der Schutz des Katheters und der Metallfeder erforderte besondere Haltungsvoraussetzungen. Die Tiere wurden einzeln in den Käfigen untergebracht. Diese standen zum visuellen, akustischen und olfaktorischen Kontakt direkt nebeneinander. Der Käfigdeckel war eine Spezialanfertigung und ermöglichte die Fixierung des Endes der Metallfeder und den direkten Anschluss des Katheters an das Inflationssystem.

3.2.2. Repetitiv-okklusives Protokoll (ROP)

Die operierten Tiere wurden nach einer 3-tägigen Erholungsphase an das repetitiv-okklusive Protokoll angeschlossen. Dabei wurden der Katheter und die Metallfeder über ein vorgefertigtes Loch im Käfigdeckel aus dem Käfig geführt und an einem freirotierenden System über dem Käfig befestigt.
Während des Protokolls wurde der Ballonkatheter computer-gesteuert *(POWER SUPPLY,BENCHTOP,HY3003D-2, KYSAN Electronics)*, d.h. vollautomatisch, über 40 Sekunden mit Luft inflatiert und dadurch die darunterliegende LAD komprimiert.
Die Hypothese bestand darin, dass in dieser Zeitspanne das Blut während der Diastole über bestehende Kollateralkreisläufe umgeleitet werden konnte. Die maximale Komprimierung von 40 Sekunden wurde aufgrund der besonderen Verhältnisse im kleinen Nagetier bestimmt. Diese können aufgrund ihrer wesentlich höheren Herzfrequenz und ihres erhöhten Stoffwechsels Ischämien schlechter kompensieren, so dass bereits nach 40-60 Sekunden mit infarkttypischen Veränderungen im EKG

gerechnet werden musste. Durch den nur 40 Sekunden langen Verschluss der LAD mit anschließender Erholungsphase können sich die Durchblutungsverhältnisse am Herzen wieder normalisieren und eine chronische Ischämie kann so gut wie ausgeschlossen werden. Für eine genaue Erläuterung des Protokolls siehe Abbildung 1.

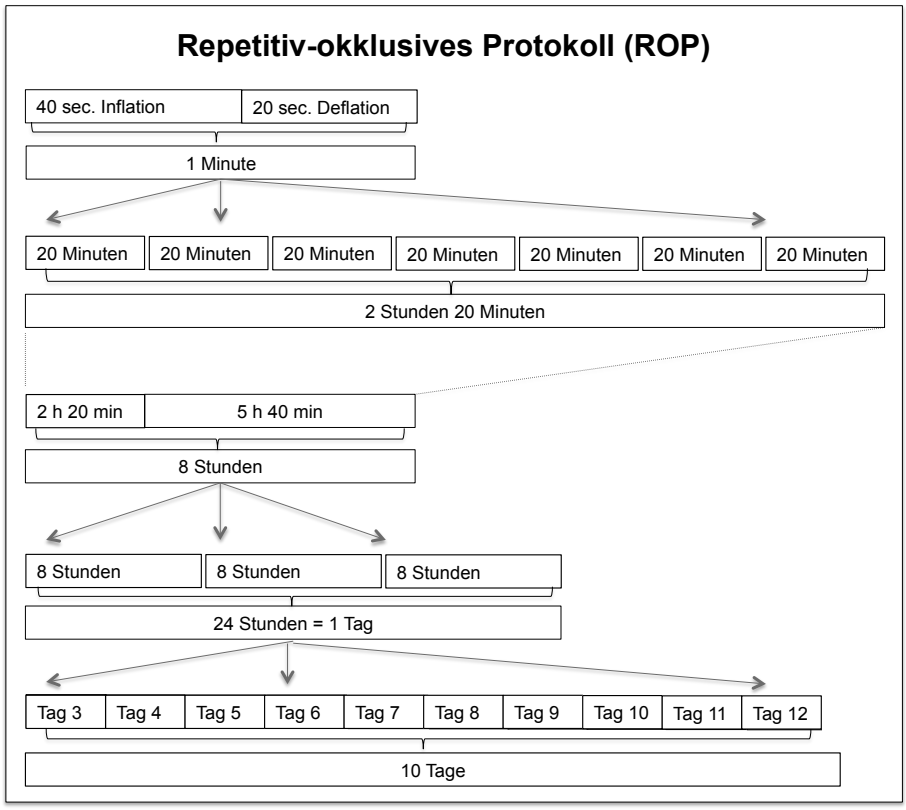

Abb. 1: Schematische Darstellung des repetitiv-okklusiven Protokolls: *über 2 Stunden und 20 Minuten erfolgt alle 20 Minuten eine 40-sekündige Okklusion des Gefäßes. Danach schließt sich eine Pause über 5 Stunden und 40 Minuten an. Dieser 8-stündige Zyklus wird 3 Mal innerhalb von 24 Stunden wiederholt.*

3.2.2.1. Pneumatischer Mini-Okkluder

Der Latex-Mini-Okkluder besteht aus einem kleinen Ballon mit Katheter. Der Ballon wird durch eine Kunststoffhülle (d 3,2mm, L 12mm) geschützt und kann über diese am Gewebe befestigt werden (siehe Abbildung 2).

Der Ballon selbst hat eine Länge von ca. 7 mm und ein Füllvolumen von 0,2-0,25 ml Luft (58).

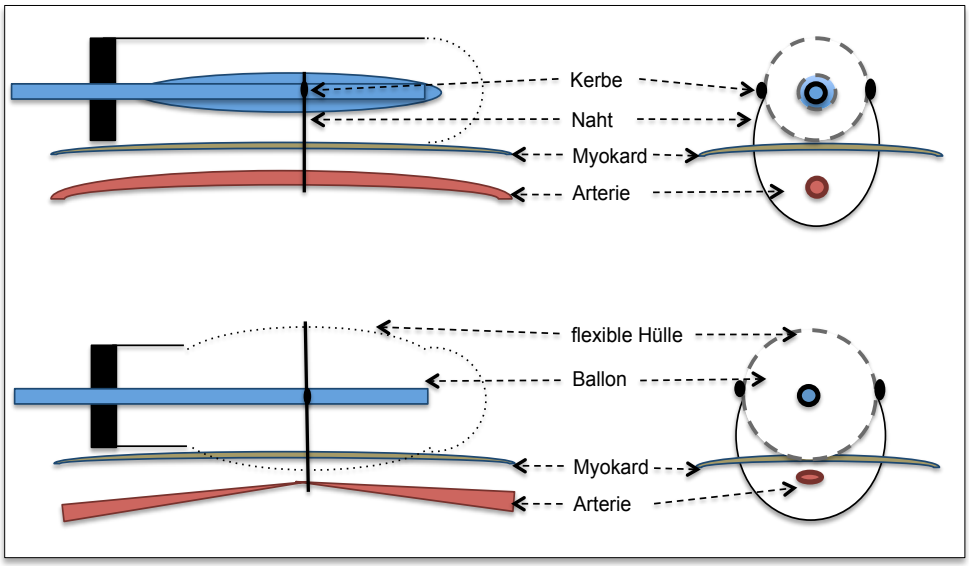

Abb. 2: Schematische Darstellung eines minipneumatischen Okkluders modifiziert nach Toyota et.al. (2007) (59): *Oben: Okkluder im deflatierten Zustand ohne Kompression der LAD. Unten: inflatierter Okkluder mit Kompression der LAD.*

3.2.2.2. Kontrolle der Katheterlage

Im Verlauf wurde die korrekte Katheterlage mittels 3-Kanal-EKG an Tag 3, 8 und 13 postoperativ kontrolliert:

Die Tiere wurden zunächst zur Narkoseeinleitung mittels Isofluraninhalationsgemisch *(1,0-2,0% Isofluran, mit 100% Sauerstoff)* für ca. 3 Minuten in eine Narkosebox *(Zitt-Thoma GmbH)* gesetzt. Dafür wurde der Isofluran-Verdampfer Vapor 2000 *(Dräger Medical AG & CoKG)* verwendet.

Nach Narkoseeintritt wurden die Tiere auf die linke Seite gedreht und an eine Narkosemaske gelegt. Die EKG-Elektroden wurden angebracht. Zunächst wurde für 3 Minuten das „Ruhe"-EKG aufgezeichnet bis der Okkluder für 40 Sekunden mit 0,6 ml Luft inflatiert wurde. In der Regel konnten daraufhin ST-Streckenveränderungen (Senkung oder Hebung) beobachtet und nach weiteren 40 Sekunden die elektrokardiographische Aufzeichnung beendet werden. War keine Veränderung der ST-Strecke zu erkennen, wurde das beschriebene Prozedere mit einer Luftinflation von 0,7 ml erneut durchgeführt.

Wenn auch der zweite Versuch erfolglos blieb, musste davon ausgegangen werden, dass der Okkluder nicht mehr richtig platziert war. Diese Tiere mussten aus dem Versuch ausgeschlossen werden.

3.2.3. Finaloperation

Nach Ablauf des standardisierten Protokolls folgte die Endoperation zur Endpunktmessung. Hierbei erfolgten die präoperative Vorbereitung, die Narkose und die intraoperative Überwachung der Tiere wie bei der Initialoperation. Der Katheter wurde mit 0,7 ml Wasser gefüllt, mittels Klemme fixiert und das Gefäß für 90 Minuten zur experimentellen Infarktsetzung komplett verschlossen. Es schloss sich eine 20-minütige Reperfusionsphase an. Danach wurde ein Katheter *(Portex®Fine Bore Polyethylene Tubing,0,58mm ID/0,96 mm OD,Smiths Medical International Ltd.)* in die linke Arteria carotis communis gelegt. Die Zeitintervalle für die Infarktsetzung und Reperfusion wurden wie beschrieben festgelegt, weil sich in diesem Zeitfenster das volle Ausmaß des Infarktes ausbildete. Je nach Endpunktmessung wurde das schlagende Herz von Blutresten befreit. Dazu wurde das jeweilige Medium mittels Pumpe *(Perfusor secura, B.Braun AG)* perfundiert und das Herz anschließend entnommen.

3.3. VERSUCHSGRUPPEN/STUDIENDESIGN

Die Tiere wurden vor der Initialoperation randomisiert in ihre jeweilige Versuchsgruppe und für die jeweilige Endpunktmessung (TTC, µCT = 10d; HISTO = 5d) eingeteilt. Für eine Gruppenübersicht siehe Tabelle 1.
Bei allen Versuchsgruppen, bis auf die SHAM-Gruppe, wurde das ROP am 3. postoperativen Tag gestartet. Auch bei der SHAM-Gruppe erfolgte die Implantation des pneumatischen Mini-Okkluders in der Initialoperation, die Tiere durchliefen aber nicht das ROP und stellten damit eine Kontrollgruppe dar.

Endpunkt-messung	ROP	SHAM	METO	VERA	RANO
TTC (10d) Gewichtsdaten EKG-Daten	7	7	6	7	5
HISTOlogie (5d)	2	2	2	2	2
µCT (10d)	2	2	-	-	-

Tab. 1: Darstellung der Versuchsgruppen: *Aufbau der Versuchsgruppen und Anzahl der Versuchstiere.µ-CT-Aufnahmen wurden lediglich für die Ebenen-Bestimmung der histologischen Schnitte angefertigt. Da sie weder quantitativ noch qualitativ ausgewertet wurden, wurden sie in der Arbeit nicht weiter erwähnt. ROP: repetitiv-okklusives Protokoll; SHAM: Kontrollgruppe; METO: ROP und Metoprolol; VERA: ROP und Verapamil; RANO: ROP und Ranolazin.*

3.4. BEHANDLUNG DER TIERE

3.4.1. Allgemeine Behandlung

Während der gesamten Sitzzeit wurde der Zustand der Tiere alle 12 Stunden mit Hilfe eines Scores, in den Schmerzempfindlichkeit und Erscheinung von Thorax- und Nackenwunde eingingen, erfasst.

Die Tiere wurden zweimal täglich mit 0,05 mg Buprenorphin *(Temgesic® 0,3mg/ml, Schering-Plough)* subkutan behandelt. Zur Prophylaxe von Infektionen wurde bis zum einschließlich 5. postoperativen Tag 7,5mg/kg Enrofloxacin *(Baytril® 25mg/ml, Bayer HealthCare AG)* als Antibiose verabreicht.

Ab Versuchsbeginn wurden die Tiere in Einzelkäfigen untergebracht (Makrolonkäfig vom Typ III). Das Gewicht wurde täglich mit einer Präzisionswaage LP6200S *(Sartorius AG)* dokumentiert.

3.4.2. Nicht-medikamentöse und medikamentöse Behandlung

Nach einer dreitägigen Erholungsphase und Ermittlung der elektrokardiographischen Ausgangswerte erhielten die Tiere die erste medikamentöse Behandlung mit den Testsubstanzen in den jeweiligen Konzentrationen.
Die Gabe erfolgte einmal täglich bis zum Absetzen 2 Tage vor der jeweiligen Finaloperation. Dadurch konnte trotz der unterschiedlichen Halbwertzeiten der applizierten Medikamente davon ausgegangen werden, dass die Medikamente zum Zeitpunkt der Infarktsetzung keinen Einfluss mehr auf den Organismus hatten.
Als Applikationsform erfolgte die Gavage mittels Ösophagussonde.
Die Kontrolltiere (ROP-und SHAM-Gruppe) erhielten je 0,5 ml Wasser am Morgen. Alle Konzentrationen wurden für Tiere mit einem Gewicht von 350 g berechnet:

3.4.2.1. Metoprolol

Da Macezwski *et al.* (2008) die Metoprolol-Wirkung über 6 Wochen nach Myokardinfarkt der Ratte untersucht hatten, konnte die applizierte Tagesdosis aus dieser Vorarbeit übernommen werden (63). Die Tiere erhielten täglich 250 mg/kg Körpergewicht/d Metoprolol *(MethoHEXAL®Succ®,190mg Retardtabletten, HEXAL AG)*, gelöst in Methylcellulose *(Methylcellulose 0,5%, Apotheke der Charité Universitätsmedizin Berlin)*. Dadurch wurde eine Verlangsamung der Herzfrequenz um 10-20% erwartet.

3.4.2.2. Verapamil

Da Sandmann *et al.* (2001) zeigten, dass die Gabe von Verapamil mit einer täglichen Dosis von über 8 mg/kg/d zu einer ausgeprägten Verschlechterung der kardialen Funktion der Ratte führte, konnte die applizierte Tagesdosis aus dieser Vorarbeit übernommen werden (53). Danach erhielten die Tiere 7,5 mg/kg KG/d Verapamil *(Verapamil 120mg-1-APharma®),* gelöst in Methylcellulose.

3.4.2.3. Ranolazin

Trotz ausführlicher Recherche konnte keine Literatur mit Dosisangaben zu einer längeren oralen Ranolazineinnahme bei Tieren gefunden werden. Die maximale humane Einzeldosis von 750mg/d wurde, unter Beachtung des metabolischen Körpergewichts in die Tierdosis umgerechnet (64). Die Tiere erhielten demnach 47mg/kg KG/d, gelöst in *(Ranexa® 750mg, Retardtabletten, A.Menarini Pharma S.R.L)* Methylcelluose.

3.5. INFARKTVOLUMINA

3.5.1. Tierzahlen

In die Messung der Infarktvolumina gingen insgesamt 32 Tiere, eingeteilt in 5 Gruppen, ein. Die Endoperation erfolgte am 13. postoperativen Tag, d.h. die Tiere bekamen über 10 Tage das ROP (58).

3.5.2. TTC-Färbung

2-,3-,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) ist ein Redoxindikator. In vitalen Zellen reduzieren Dehydrogenasen der Atmungskette das farblose Tetrazolium-Kation zum rötlichen Formazan, d.h. dass sich bei der TTC-Färbung avitales Gewebe weiß, das vitale Gewebe rosarot färbt (65). Da die TTC-Färbung Folge einer Redoxreaktion ist und die 90-minütige Ligatur über eine Hemmung der Atmungskette zu einem vermehrten Anfall von zytosolischem NADH führt, würde die Färbung ohne die anschließende 20-minütige Reperfusionsphase nicht funktionieren. Da sich NADH auch im postokklusiven, vitalen Gebiet ansammelt, würde dieses ebenfalls als Infarkt dargestellt werden (66, 67).
Nach finaler Infarktsetzung und 20-minütiger Reperfusionsphase wurde das Herz, wie bereits oben erwähnt, über einen linksseitigen Arteria carotis-communis-Katheter mit 10 ml PBS *(phosphat-gepufferte Salzlösung 80 g NaCl + 2 g KCl + 14,4 g Na_2HPO_4 + 2,4 g KH_2PO_4 auf 1000ml Aqua dest., pH einstellen auf 7,4 mit NaOH/HCl)* perfundiert und dann entnommen.

Das entnommene Herz wurde von überschüssigem Bindegewebe befreit und der rechte Vorhof und Ventrikel wurden entfernt und verworfen. Das linke Herz (linker Vorhof/Ventrikel) wurde in einer 2 ml Spritze *(Injekt® Solo, B.Braun Melsungen AG)* für 10 Minuten bei -20 Grad tiefgefroren. Anschließend wurden Schnitte vom Herzen angefertigt.
Dafür wurden von den Herzen mit Hilfe einer Schneideschiene und Rasierklinge *(Apollo CK07.1, Carl Roth GmbH & CoKG)* 8 bis 9 2-Millimeter dicke Schnitte angefertigt. Es folgten die 20-minütige Färbung der einzelnen Schnitte mittels 2%i-ger TTC-Lösung *(0,2 g TTC in 10 ml PBS x1)* bei 37 °C im Wasserbad und die 15-minütige Fixierung mit 4 %iger Formaldehydlösung.
Im Anschluss an die Fixierung wurden mit einer Digitalkamera Modell SuperShot S70 (Canon Deutschland GmbH) am Mikroskop, Modell MZ6 (Leica Microsystems GmbH), Fotos der Schnitte (beidseitig) mit 1-fachem Zoom angefertigt.

3.5.3. Auswertungstechnik

Die Infarktvolumina wurden mittels Adobe Photoshop ausgewertet.
Als Infarktvolumen wurde jede weiße Fläche definiert, die deutlich vom umliegenden Gewebe abzugrenzen war und eindeutig von Bindegewebe unterschieden werden konnte. Dabei wurden von jedem Schnitt das Gesamtvolumen und das Infarktvolumen erhoben und diese zueinander ins Verhältnis gesetzt.
So wurde dann für jedes Tier der prozentuale Mittelwert des Infarktvolumens im Verhältnis zum Gesamtvolumen berechnet. Diesen Auswertvorgang führten zwei Personen unabhängig voneinander durch. Die Auswertung erfolgte „blind“, d.h. die Auswerter wussten nicht welches Tier zu welcher Gruppe gehörte.

3.6. ELEKTROKARDIOGRAPHISCHE DATEN

Die elektrokardiographischen Daten wurden mit dem EKG-Programm LabChart pro *(ADInstruments Ltd)* erfasst und in einer Excel-Testanalysedatei ausgewertet.
Für die Auswertung der Daten wurde mit Ausnahme der Herzfrequenzen (EKG von Tag 7) das EKG der Finaloperation verwendet.

Die Auswertung erfolgte auch hier „blind“, d.h. die auswertende Person wusste nicht, welches Tier zu welcher Gruppe gehörte.

3.6.1. Herzfrequenzen

Als Ausgangswert für die Herzfrequenzen wurde das EKG vom zweiten postoperativen Tag verwendet und dieser mit den Werten an Tag 8 nach Beginn der Medikamentengabe verglichen.
Zur Erfassung der jeweiligen durchschnittlichen Herzfrequenz wurde ein zweiminütiges Zeitintervall gewählt, das 30 Sekunden nach Beginn der EKG-Aufzeichnung gestartet wurde.

3.6.2. Maximale ST-Hebungen

Da in klinischen Studien eine ST-Hebung ≥ 0,1mV bei 1-minütiger Koronargefäßokklusion mit einer hohen Mortalität und einem geringen Kollateralblutfluss einhergehen (68), wurden die ST-Streckenveränderungen auch im koronaren Arteriogenesemodell analysiert.
Die Berechnung des ST-Hebungsmittelwertes in einem Zeitintervall von 30 Sekunden vor der Ligatur ermöglichte es, den Ausgangswert zu definieren.
Anschließend wurden die ST-Hebungen bis 30 Minuten nach Ligatur analysiert und in die vorher extra dafür programmierte Excel-Flächeninhaltsdatei samt des vorher erhobenen Ausgangswertes eingefügt.
Nach Abziehen des Offset konnten die ST-Hebungen der ersten 1200
Schläge nach der Größe der Werte geordnet werden, der höchste Wert wurde als maximale ST-Hebung definiert.

3.6.3. R-Amplitudenverluste

Da laut Literatur das Ausmaß der R-Amplitudenabnahme gut mit dem Infarktausmaß korrelieren soll (69), wurde auch der R-Amplitudenverlust im koronaren Arteriogenesemodell untersucht.
Um den Ausgangswert zu definieren, wurde der R-Amplituden-Mittelwert über

ein 20-Sekunden-Zeitintervall bis 10 Sekunden vor der Ligatur berechnet.
Die R-Amplituden der ersten 90 Minuten nach Ligatur wurden gemittelt und mit dem Ausgangswert verglichen. Zudem wurde die prozentuale Abnahme des R-Amplitudenmittelwertes gegenüber des Ausgangswertes mithilfe eines Dreisatzes berechnet.

3.6.4. Herzrhythmusstörungen

Da es aufgrund der hohen Herzfrequenz der Ratte nicht einfach möglich ist, die Humankriterien für schwerwiegende Herzrhythmusstörungen (nicht anhaltende ventrikuläre Tachykardien) auf die Ratte zu übertragen, wurden die Herzrhythmusstörungen der einzelnen Gruppen nach der Lown-Klassifikation eingeteilt (70, 71) (siehe Tabelle 2).

Grad	Definition	Klinische Bedeutung
0 I II	Keine VES * Monomorphe VES (< 30/h) * Monomorphe VES (> 30/h)	Einfache/“niedriggradige″ ventrikuläre Extrasystolen (VES)
IIIa IIIb IVa IVb V	Polymorphe VES Ventrikulärer Bigeminus * Couplets (2 VES hintereinander) * Salven (≥ 3 VES hintereinander) * R- auf T-Phänomen	Komplexe/″hochgradige″ ventrikuläre Extrasystolen (VES)

Tab. 2: Darstellung der Lown-Klassfikation modifiziert nach Herold et al. (2014) (72): *Mit *-markierte Rhythmusstörungen konnten bei den Versuchstieren beobachtet werden.*

Es wurde nicht auf die Anzahl der auftretenden Herzrhythmusstörungen eines Tieres geachtet, sondern ausschließlich der höchst auftretende Grad erfasst. Der Grad V nach Lown wurde nicht beachtet, da alle Tiere, die diesen Grad erreichten, die Finaloperation nicht überlebten und damit nicht in die Auswertung eingeschlossen werden konnten.

3.7. HISTOMORPHOLOGISCHE DATEN

3.7.1. Tiermaterial und Vorbereitung

Für die histomorphologischen Daten wurden insgesamt 10 Tiere a 5 Gruppen, d.h. 2 Tiere pro Gruppe, mit Finaloperation am 7. postoperativen Tag geplant. Um die Tieranzahl so gering wie möglich zu halten, sollte eine rein qualitative Auswertung erfolgen.

Der Zeitpunkt wurde so gewählt, da am 12. postoperativen Tag bereits der Umbauprozess der Kollateralgefäße sowie die inflammatorische Reaktion abgeschlossen waren und damit histomorphologisch nicht mehr dargestellt werden konnten.

Um das Herz blutleer zu spülen, wurden 100 ml PBS und anschließend 10 ml einer Tissue-Tek®-Lösung *(1:3 in PBS)* über einen Arteria carotis-Katheter mit einer Spritzpumpe appliziert.

Das blutleere Herz wurde entnommen und Bindegewebsreste sowie Aorta und Pulmonalgefäße entfernt.

Die Präparate wurden einer Saccharose-Konzentrationsreihe zugeführt, d.h. die Herzen wurden zunächst für 24 Stunden in einer 10%-igen Saccharoselösung bei 4 Grad gelagert. Die Konzentrationsreihe wurde dann in 10-er Schritten fortgeführt, bis eine ausreichende Saccharose-Sättigung, erkennbar am Absinken des Präparates, erreicht war. Es folgte das Einfrieren für 10 Minuten bei -20 Grad in einer 3 ml Spritze *(Injekt® Solo, B.Braun Melsungen AG).*

3.7.2. Kryo-Einbetttechnik und Schnittanfertigung

Zur Einteilung der Herzen in drei Ebenen (ausgehend von der Herzspitze) wurden mittels Schneideapparatur 4 mm dicke Schnitte angefertigt. Die einzelnen Ebenen wurden in Kryoförmchen *(TissueTek® Cryomold® Standard, Sakura Finetek Europe B.V.)* in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zur Fixierung wurde TissueTek® verwendet und die Blöcke bei -80 Grad weggefroren.

Nach der μ-CT-Untersuchung einiger Herzen war davon auszugehen, dass die Kollateralgefäßbildung vor allem in Ebene 3 zu finden war. Es wurden 10 µm dicke Schnitte von dieser Ebene angefertigt und diese immunhistochemisch gefärbt.

3.7.3. Immunhistochemische Färbung

Pro Tier wurden je 6 Schnitte gefärbt, davon wurden jeweils 2 Schnitte mit dem ersten und jeweils 2 Schnitte mit dem zweiten Färbeansatz gefärbt (s.u.).
Obligat war die Simultanfärbung 2-er Negativkontrollschnitte, bei der die Schnitte mit 1:20 PBSA-Lösung *(bovines Serumalbumin in PBS)* statt eines Primärantikörpers inkubiert wurden.
Da die Einwanderung von Monozyten für die Arteriogenese eine entscheidende Rolle spielt, erfolgte im 1. Färbeansatz eine Primärantikörper-Färbung gegen den Monozytenmarker CD 68 (73).
Im 2. Färbeansatz wurden die Schnitte mit dem monoklonalen Mouse Anti-Rat Ki67-Antikörper gefärbt. Dieser stellt einen speziellen Proliferationsmarker für Rattengewebe dar und ermöglicht das während des aktiven Zellzykluses im Zellkern exprimierte Ki67-Antigen zu markieren (74). Zur Detektion der Primärantikörper wurden diese anschließend mit einem Cy3-konjugierten Sekundärantikörper markiert. Zur Erleichterung der Arteriolendetektion erfolgte zusätzlich die Simultanfärbung mit einem Antikörper zur spezifischen Darstellung des α-Aktins der glatten Gefäßmuskulatur (75).
Um mögliche unspezifische Färbungen besser abklären zu können, erfolgte zudem eine Hoechst-Kernfärbung.

Nach der Lufttrocknung der Schnitte folgten die 10-minütige Fixierung in reinem Aceton und das Freilegen der Epitope mittels 45-minütiger Behandlung mit 0,5%-igem Tween® 20. Daraufhin wurden die Schnitte mit einem Fettstift *(Dako Pen, Dako Denmark, Glosturp)* umrandet und anschließend unspezifische Bindungen mittels Blockingsolution *(1:10000 10%-iges bovines Serumalbumin + 1:20000 Ziegenserum in PBS)* blockiert. Anschließend wurden die Schnitte mit dem Primärantikörper behandelt und diese jeweils für 1,5 Stunden *(1.Färbeansatz: 1:50 CD68 in 2%igem PBSA (1:20 bovines Serumalbumin in PBS)* bzw. über Nacht *(2. Färbeansatz: 1:50 Ki67 in 2%-igem PBSA in Dunkelkammer bei 4 Grad celsius)* inkubiert. Nach mehreren Waschschritten mit PBS

folgte dann für 60 Minuten die Inkubation mit dem Sekundärantikörper Cy3. Anschließend wurde die 30-minütige α-FITC-Färbung *(1:100 in PBS)* und nach mehreren Waschschritten in PBS abschließend die Kernfärbung *(1:1000 in PBS)* durchgeführt. Alle Färbeschritte erfolgten, mit Ausnahme der Ki67-Färbung (s.o.), bei Raumtemperatur in einer Dunkelkammer. Nach der erfolgreichen Färbung wurden die Schnitte mit Fluoromount-G eingedeckelt und lufttrocken, abgedunkelt bei -20 Grad aufbewahrt.

Die immunfluoreszierenden Aufnahmen wurden mittels Fluoreszenzmikroskop DMR HC *(Leica Microsystems GmbH)* in 20-facher Vergrößerung angefertigt. Die Färbesequenzen wurden einzeln eingestellt und die Fotos am Ende in Overlaytechnik zusammengefügt.

3.8. STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Daten erfolgte mit dem Statistikprogramm GraphPad Prism (Version 6.0f, GraphPad Software, Inc., La Jolla/ California/USA).

Die Analyse der Daten erfolgte mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) als Gruppentest. Zur post-hoc Analyse von Gruppenunterschieden wurde der Dunnett-Test angewendet, Referenzkategorie war Gruppe ROP. Dabei galt ein p-Wert von < 0,05 als signifikant.

Der Vergleich der Herzrhythmusstörungsdaten erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test und ergab einen p-Wert von 0,080. Alternativ (wegen vieler gleicher Werte der ordinalen Lown-Skala) wurde ein Fisher exact test berechnet, p= 0,078. Alle Gruppen wurden mit dem Wilcoxon-Test gegen Gruppe ROP getestet (p-Werte nominal, ohne Korrektur für multiples Testen).

Zur Korrelationsanalyse wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson angewendet (α = 0,05 %).

Im Text erfolgte die Angabe aller Daten als Mittelwert (Mean) ± Standardabweichung (SD). Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurden Box-Plots verwendet.

In den Abbildungen gilt: + = p < 10%
* = p < 5%
** = p < 1%

3.9. MATERIALAUFLISTUNG

Chemikalien, Bioreagenzien & Antikörper	Hersteller
Aceton	*J.T.Baker®/Avantor™ Performance Materials, Philipsburg/New Jersey/Vereinigte Staaten*
bovines Serumalbumin	*Sigma-Aldrich® Corp.,St.Louis/Missouri/Vereinigte Staaten*
Fluoromount G	*SouthernBiotech, Birmingham/ Alabama/ Vereinigte Staaten*
Goat serum	*Sigma-Aldrich® Corp.,St.Louis/ Missouri/ Vereinigte Staaten*
TissueTek®	*O.C.T. ™ Compound, Sakura Finetek Germany GmbH, Deutschland*
2-,3-,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)	*Dye content > 95 %, Sigma-Aldrich® Corp.,St.Louis/ Missouri/ Vereinigte Staaten*
Tween® 20	*Sigma-Aldrich® Corp.,St.Louis/ Missouri/ Vereinigte Staaten*
CD68	*AbD Serotec, Düsseldorf, Deutschland*
Cy3-konjugierter Sekundärantikörper, (*Cy™3-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H&L))*	*Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove/Pennsylvania/Vereinigte Staaten)*
Hoechst 33342 *(Trihydrochlorid, Trihydrate)*	*Life Technologies™ Corp./Molecular Probes®, Carlsbad/California/ Vereinigte Staaten*
Anti-Rat Ki67-Antikörper, *(Monoclonal Mouse Anti-Rat Ki-67 Antigen, Clone MIB-5)*	*Dako Denmark, Glosturp / Dänemark*
α-Smooth-muscle-actin-Antikörper *(Monoclonal Anti-Actin, α-Smooth Muscle-FITC antibody produced in mouse)*	*Sigma-Aldrich® Corp., St.Louis/ Missouri/ Vereinigte Staaten*

4. ERGEBNISSE

4.1. GEWICHTE

4.1.1. Gewichtsverlauf

Die ROP- und SHAM-Gruppe hatten ein durchschnittliches Ausgangsgewicht von ROP 359,7 g ± 30,22 und SHAM 354,8 g ± 31,68.

Bei den medikamentös-behandelten Gruppen hatte die METO-Gruppe ein Ausgangsgewicht von 341,63 g ± 13,21, die VERA-Gruppe eines von 334 g ± 10,95 und die RANO-Gruppe eines von 338,35 g ± 9,07, so dass sich keine signifikanten Unterschiede beim Ausgangsgewicht zeigten.

Da der Okkluder ein Eigengewicht von ca. 9 g aufwies, stiegen die Gewichte aller Gruppen nach Okkluderimplantation am 1. postoperativen Tag etwa um die 8,04 g ± 8,55 an.

Im Verlauf des Protokolls erholte sich das Gewicht der nicht-medikamentös behandelten Tiere bis über das Ausgangsgewicht hinaus. Die medikamentös-behandelten Tiere konnten die Prozedur weniger gut kompensieren, v.a. die VERA-Gruppe zeigte erst spät einen konstanten Gewichtsverlauf (siehe Abbildung 3).

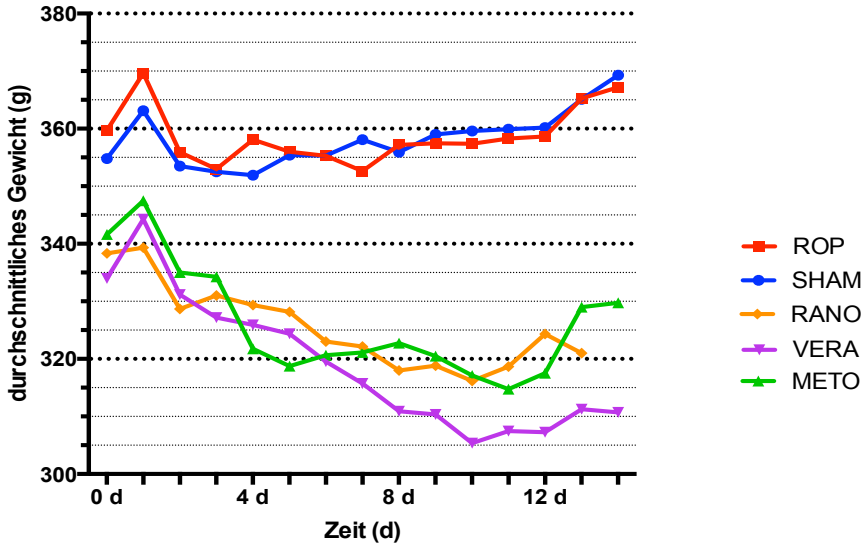

Abb. 3: Graphische Darstellung der Gewichtsverläufe über den Versuchszeitraum*: Es zeigte sich ein besonders starker Gewichtsverlust der*

medikamentös-behandelten Tiergruppen und deren Unvermögen, im Vergleich zu den Kontrollgruppen (ROP und SHAM), ihr Gewicht auf das Ausgangsgewicht zu normalisieren.

4.1.2. Durchschnittliche Gruppengewichte

Bei der Analyse der durchschnittlichen Gruppengewichte über den gesamten Beobachtungszeitraum von 12 Tagen zeigten die medikamentös-behandelten Gruppen mit METO 326,13 g ± 9,710, VERA 319, 04 g ± 11,62 und RANO 325,5 g ± 7,29 ein signifikant geringeres durchschnittliches Gewicht als die nicht-medikamentös-behandelten Gruppen (ROP 358,78 g ± 4,91 und SHAM 358,2 g ± 4,82). Mit einem p-Wert von < 1% (p = 0,009) zeigte besonders die VERA-Gruppe (319,04 g ± 11,62) ein signifikant geringeres Durchschnittsgewicht als die ROP-Gruppe.
Wie erwartet, zeigte sich kein signifikanter Gewichtsunterschied zwischen der ROP (358,78 g ± 4,91)- und SHAM-Gruppe (358,2 g ± 4,82) (siehe Abbildung 4).

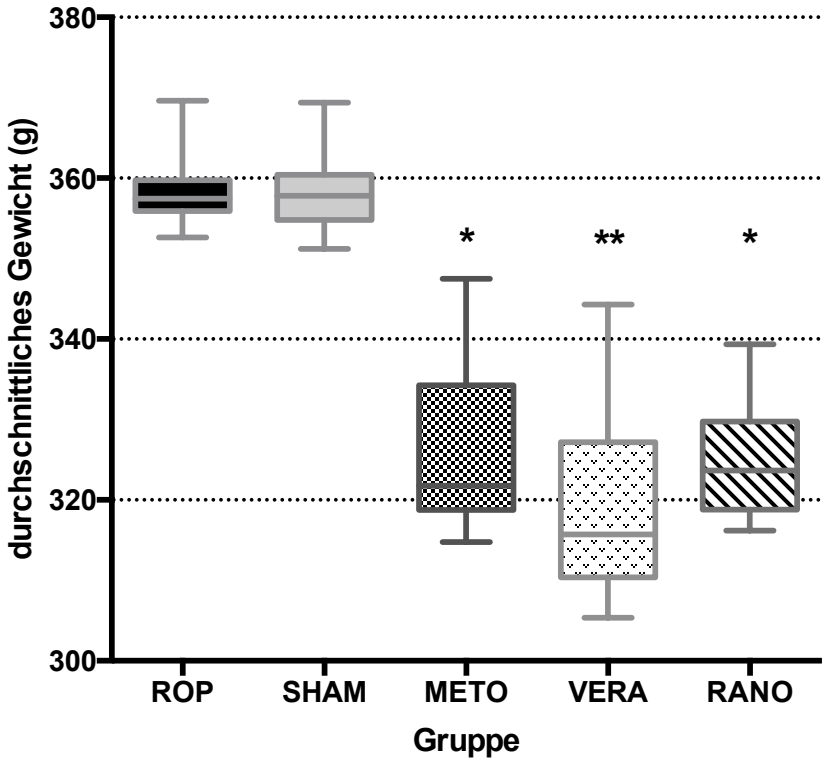

Abb. 4 : Vergleich der durchschnittlichen Gruppengewichte: *Auffällig war das signifikant geringere Durchschnittsgewicht der medikamentös-behandelten Tierguppen*

*im Vergleich zu den Kontrollgruppen (ROP und SHAM). Es gilt: p < 10% = +, p < 5% = *, p < 1% = **.*

4.2. INFARKTVOLUMINA

4.2.1. Färbung und durchschnittliche Infarktgröße

Mittels TTC-Färbung konnte das avitale Gewebe als helle, vom umliegenden rot gefärbten, vitalen Gewebe, gut abgrenzbare Struktur dargestellt und ausgewertet werden (siehe Abbildung 5).

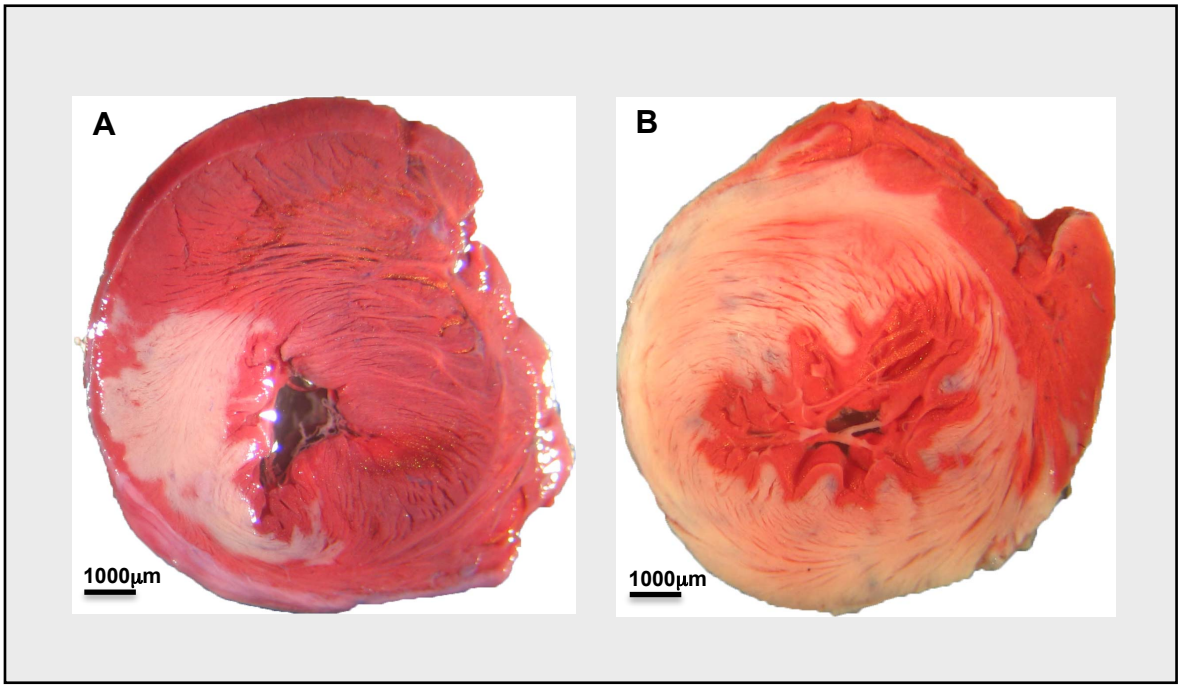

Abb. 5: Darstellung der Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)-Färbung: *Das avitale Gewebe blieb farblos, vitales Gewebe zeigte eine intensive Rotfärbung; A: Beispiel für die TTC-Färbung eines 10-Tage ROP-Tieres; B: Beispiel für die TTC-Färbung eines 10-Tage SHAM-Tieres.*

Bei der Finaloperation lag die durchschnittliche Körpertemperatur aller Gruppen bei 37,03° C ± 0,66, so dass ein Einfluss der Körpertemperatur auf die Infarktvolumina ausgeschlossen werden konnte.

Das durchschnittliche Ventrikelvolumen aller Gruppen lag bei 1368, 61 mm³ ± 440,43. Es zeigten sich dabei zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede.

Bei der Analyse der durchschnittlichen Infarktvolumina, bezogen auf die Gesamtvolumina der untersuchten Herzen, zeigten alle untersuchten Gruppen (SHAM 15 % ± 3,2, METO 11,3 % ± 7,3, VERA 14,1 % ± 4,5 und RANO 15,6 % ± 8,2) im Vergleich zur ROP-Gruppe (6,9 % ± 3,2) ein durchschnittlich größeres Infarktareal.

Die Unterschiede fielen jedoch weder zwischen der ROP- und SHAM-Gruppe noch der ROP-Gruppe und den medikamentös-behandelten Gruppen signifikant aus.

Mit einem p-Wert von je < 10% konnte man bei der SHAM- (p = 0,089) und RANO- (p = 0,062) Gruppe die Tendenz zu größeren Infarktarealen erkennen (siehe Abbildung 6).

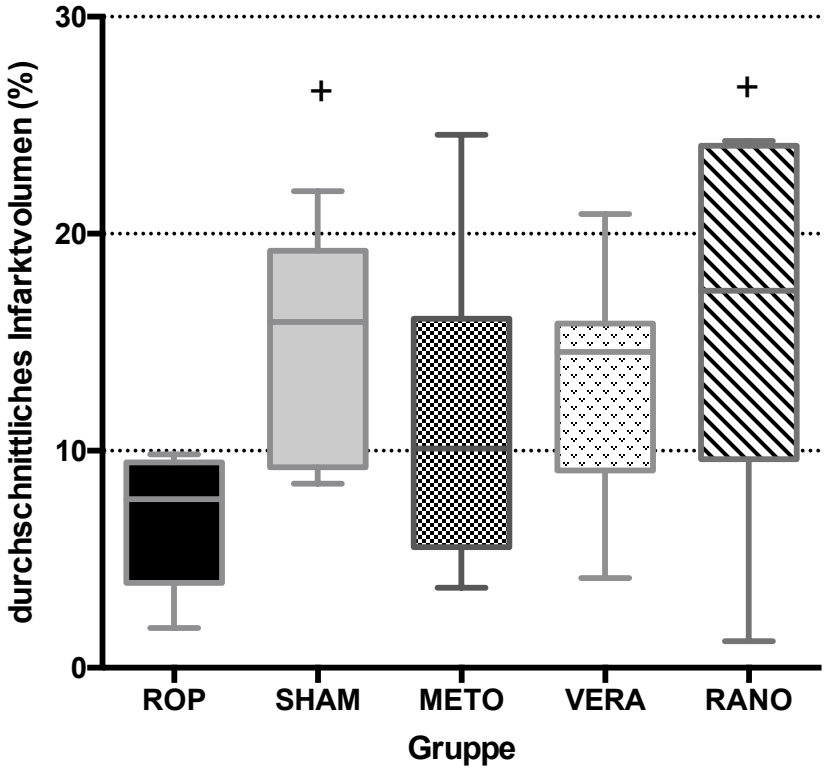

Abb. 6: Darstellung der durchschnittlichen Infarktvolumina mittels TTC-Färbung: *Die SHAM-und VERA-Gruppe zeigten doppelt so große Infarktvolumina im Vergleich zur ROP-Gruppe. Es gilt: p < 10 % = +, p < 5 % = *, p < 1 % = **.*

4.2.2. Mögliche Einflussfaktoren auf die Infarktvolumina

Bei der Überprüfung möglicher Einflussfaktoren auf die Infarktvolumina zeigten sowohl das durchschnittliche Gewicht (p = 0,9934) als auch die Herzfrequenz am 7. postoperativen Tag (p = 0,4044) graphisch als auch statistisch keine signifikante Korrelation zu den Infarktvolumina der Tiere (siehe Abbildung 7), so dass mögliche Fehlerquellen weitestgehend ausgeschlossen werden konnten.

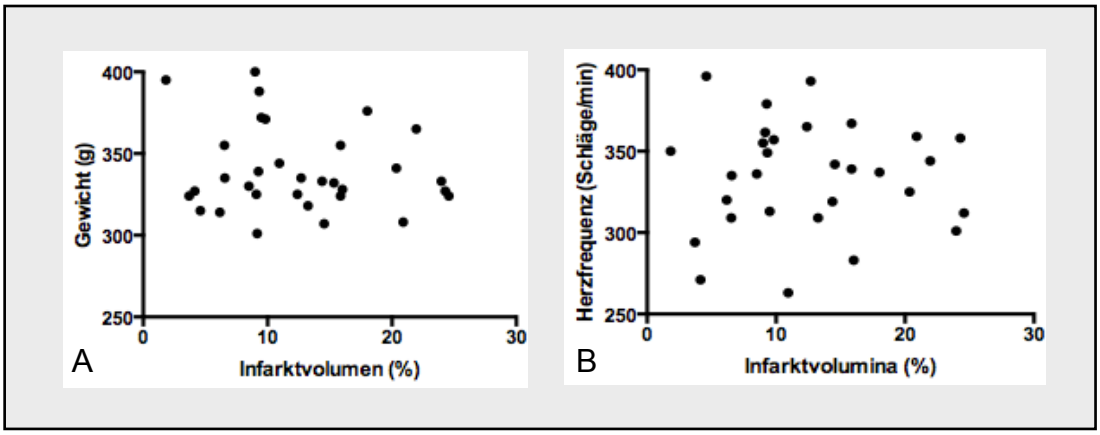

Abb. 7: Graphische Korrelationsdarstellung*; Es zeigten weder das durchschnittliche Gewicht noch die durchschnittliche Herzfrequenz einen Einfluss auf die Infarktvolumina. A : Einfluss von Gewicht am 7. postoperativen Tag auf die Infarktgröße; B : Einfluss der durchschnittlichen Herzfrequenz an Tag 7 auf die Infarktgröße.*

4.3. EKG-DATEN

4.3.1. Herzfrequenzabnahme

Die Analyse der Herzfrequenzabnahme der nicht medikamentös-behandelten Gruppen ROP 7,65 % ± 8,52 und SHAM 8,80 % ± 6,45 zeigte keinen signifikanten Unterschied. Im Vergleich zur ROP-Gruppe zeigte bei den medikamentös-behandelten Gruppen lediglich die METO-Gruppe eine signifikant höhere Herzfrequenzabnahme mit 20,31 % ± 4,83, p = 0,032 (VERA -8,49 % ± 9,49 und RANO -11,94 ± 7,20) (siehe Abbildung 8).

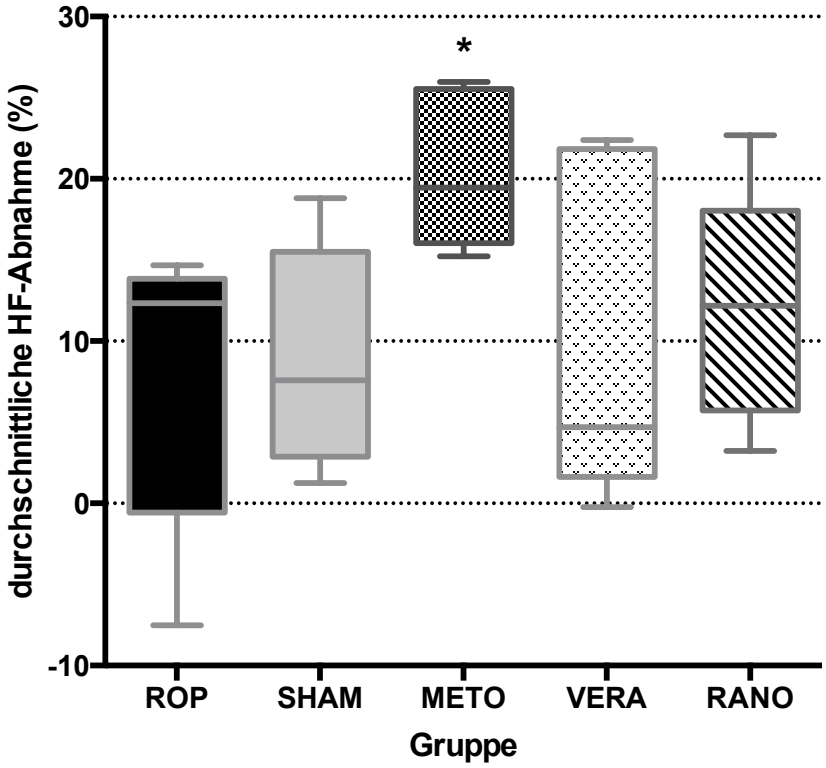

Abb. 8: Darstellung der durchschnittlichen Herzfrequenzabnahme Tag 3 bis 7 post operationem: *Nur die METO-Gruppe zeigte eine signifikante Abnahme der Herzfrequenz im Vergleich zur ROP-Gruppe. Es gilt: p < 10 % = +, p < 5 % = *, p < 1 % = **.*

4.3.2. Maximale ST-Hebung und ST-Streckenveränderung

Bei der Auswertung der ST-Streckenveränderungen nach Infarktsetzung wiesen 28 Tiere einen ST-Hebungsinfarkt (STEMI) und 4 Tiere ST-Streckensenkungen (NSTEMI) auf. Es zeigten sich dabei keine signifikanten Gruppenunterschiede.

Bei der Analyse der ST-Hebungsdaten nach experimenteller Infarktsetzung zeigte die RANO-Gruppe mit einer durchschnittlichen, maximalen ST-Hebung von 0,13 mV ± 0,063 im Vergleich zur ROP-Gruppe mit 0,055 mV ± 0,033 signifikant höhere Werte (p = 0,035).

Die SHAM- und VERA-Gruppe zeigten mit 0,124 mV ± 0,066 und 0,122 mV

± 0,055 bei p-Werten < 10 % im Vergleich zur ROP-Gruppe eine Tendenz zu höheren ST-Hebungen.

Die mit Metoprolol behandelten Tiere (METO) zeigten mit einer ST-Hebung von 0,074 mV ± 0,063 keinen signifikanten Unterschied zur ROP-Gruppe (siehe Abbildung 9).

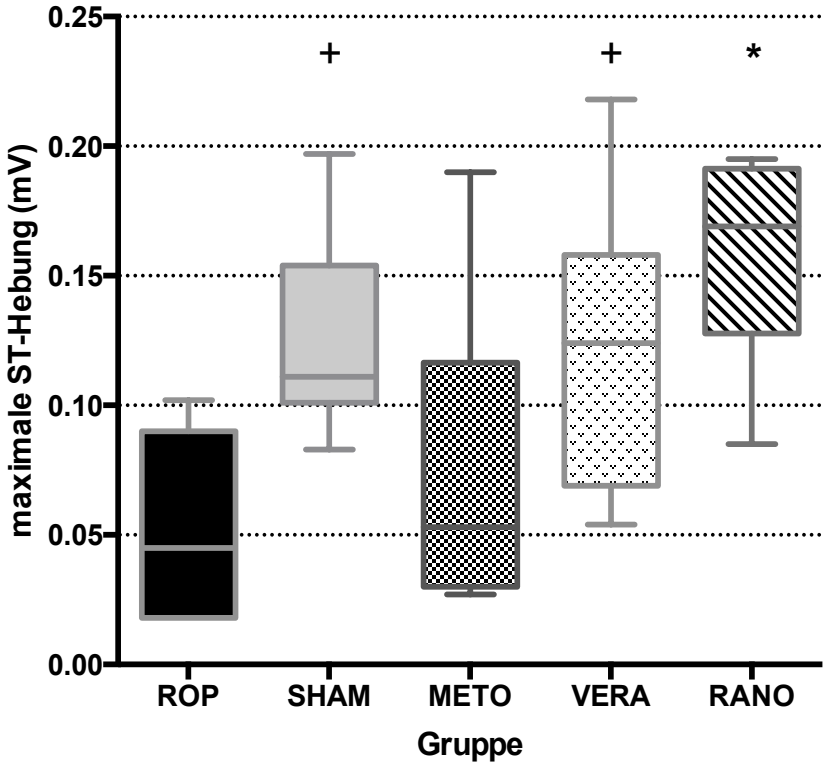

Abb. 9: Darstellung der maximalen ST-Hebung innerhalb eines 30-minütigen Intervalls nach Infarktsetzung*: Die RANO-Gruppe zeigt eine signifikant höhere ST-Hebung, die SHAM-und VERA-Gruppe eine Tendenz zu höheren ST-Hebungen im Vergleich zur ROP-Gruppe. Es gilt p < 10% = +, p < 5 % = *, p < 1 % = **.*

4.3.3. R-Amplitudenverlust vom Ausgangswert

Der prozentuale R-Amplitudenverlust vom Ausgangswert der SHAM-Gruppe mit 63 % ± 16 (p = 0,026) als auch der VERA-Gruppe mit 70 % ± 44 (p = 0,009) war signifikant höher als der R-Amplitudenverlust der ROP-Gruppe (20 % ± 15).

Sowohl die METO-Gruppe mit einem R-Amplitudenverlust von 27 % ± 12 als auch die RANO-Gruppe mit einem Verlust von 43 % ± 26 zeigten zwar höhere Werte als die ROP-Gruppe, jedoch keine Signifikanz (siehe Abbildung 10).

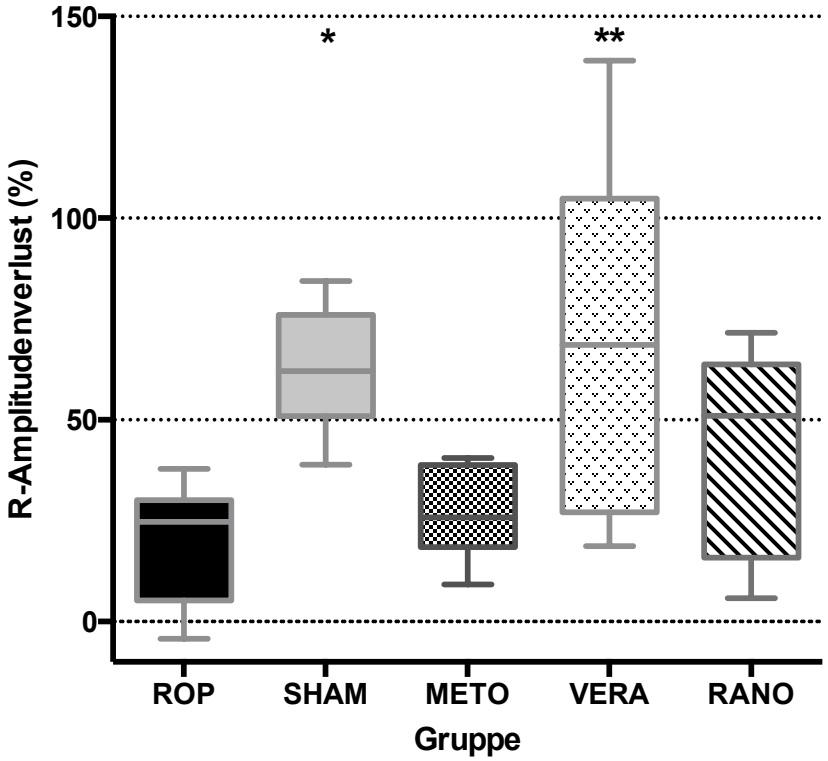

Abb.10: Darstellung des durchschnittlichen R- Amplitudenverlustes in einem 90-minütigen Intervall nach Infarktsetzung: *Sowohl die SHAM- als auch die VERA-Gruppe zeigten einen signifikanten höheren R-Amplitudenverlust im Vergleich zur ROP-Gruppe. Es gilt: p < 10 % = +, p < 5 % = *, p < 1 % = **.*

4.3.4. Herzrhythmusstörungen

Bei der Analyse der Herzrhythmusstörungen nach der Lown-Klassifikation wurden bei den medikamentös-behandelten Gruppen im Vergleich zur ROP-Gruppe vermehrt hochgradige Herzrhythmusstörungen beobachtet.

Dabei wies die VERA-Gruppe im Vergleich zur ROP-Gruppe ein signifikant häufigeres Auftreten von hochgradigen Herzrhythmusstörungen (p = 0,005) auf.

Mit einem p-Wert von < 10 % zeigte die RANO-Gruppe (p = 0,064) eine Tendenz zu höhergradigen Herzrhythmusstörungen im Vergleich zur ROP-Gruppe (siehe Abbildung 11).

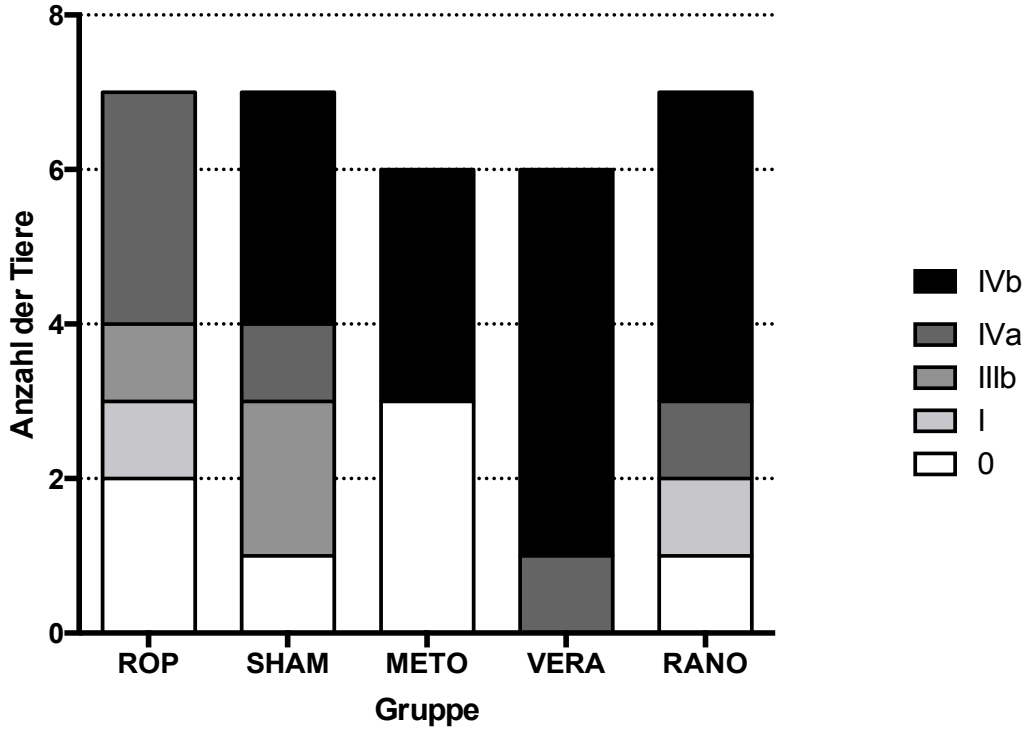

Abb. 11: Graphische Darstellung des Auftretens von Herzrhythmusstörungen nach der Lown-Klassifikation: *Auffällig ist das vermehrte Auftreten von Grad IVb Herzrhythmusstörungen in den Gruppen, die mit Medikamenten behandelten wurden, die in die intrazelluläre Calciumhomöostase eingreifen.*

4.4. IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG

Histologische Schnitte und immunhistochemische Färbungen wurden von Herzen aus Tieren angefertigt, die über 10 Tage das repetitiv-okklusive Protokoll erhalten hatten. Nachdem weder eine vermehrte Proliferation (Ki67-Antikörper) noch das vermehrte Einwandern von Monozyten (CD68) nachweisbar waren, wurde die Prozedur mit Tieren, die das Protokoll nur über 5 Tage erhalten hatten, wiederholt.

Bei den immunhistochemischen Färbungen stellten sich sowohl der Proliferationsmarker Ki67, als auch der Monozytenmarker CD68 rot dar. Die Gefäßwände konnten mittels α-Smooth-Muscle-Actin (SMA)-Färbung grün dargestellt werden und die Hoechst-Kernfärbung zeigte sich blau.

Qualitativ ließ sich festhalten, dass bei allen untersuchten Gruppen Proliferation sowie Monozyten in der Umgebung des Okkluders nachweisbar waren. Zwischen den einzelnen Gruppen zeigten sich kaum Unterschiede. Die ROP-Gruppe wies im Vergleich zur SHAM-Gruppe proliferierende Zellen an der Gefäßwand auf.
Direkt am Gefäß zeigte nur ein Tier der VERA-Gruppe, nach 10 Tagen repetitiv-okklusivem Protokoll, eine vermehrte Proliferation (Siehe Abbildung 12).

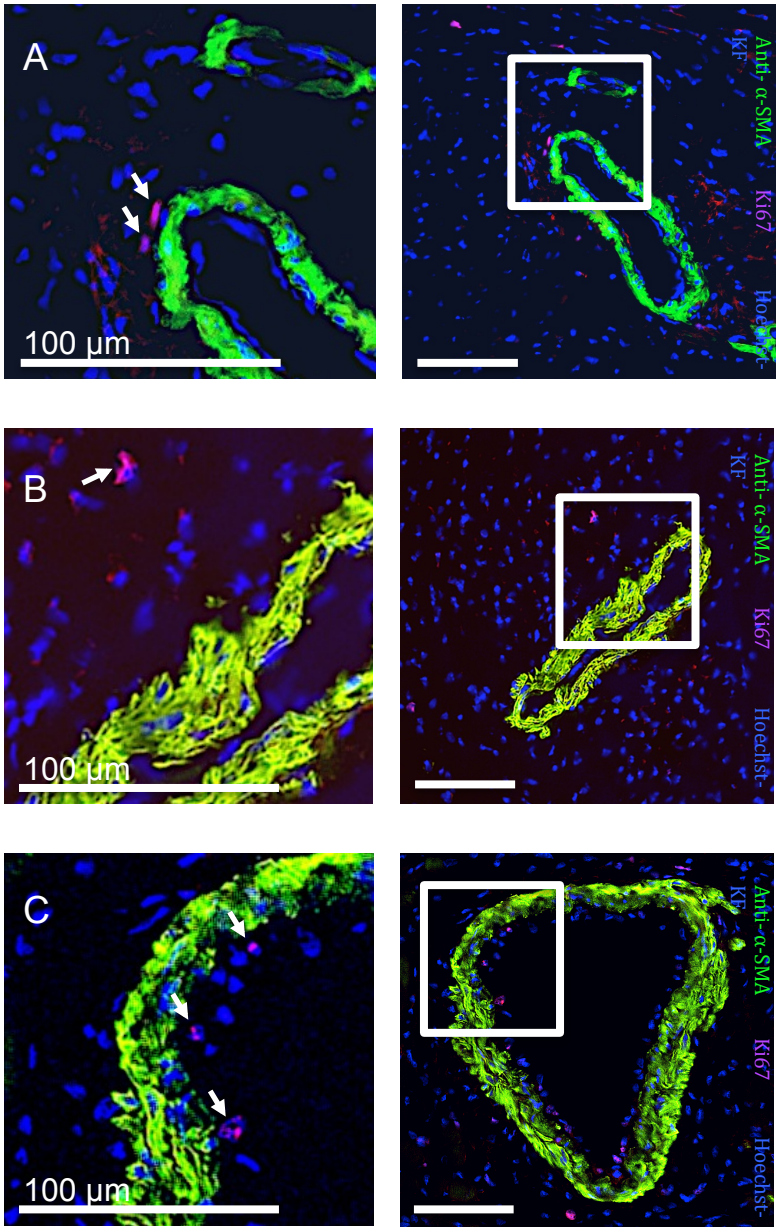

Abb. 12: Beispielbilder für immunhistochemische Proliferationsfärbung mit Ki67: *Proliferationsmarker-rot; Anti-α-SMA-grün; Hoechst-Kernfärbung-blau. Links: vergrößerter Bildausschnitt. Rechts: Bildübersicht; A: 5-Tage ROP; B: 5-Tage SHAM; C: 10-Tage VERA.*

5. DISKUSSION

5.1. REPETITIV-OKKLUSIVES MODELL DER RATTE

Ziel des ROP-Modells ist es über regelmäßig wiederholte, kurze Okklusionen der LAD die progressive Stenose eines KHK-Patienten zu simulieren und über wiederholte Veränderungen der Strömungsverhältnisse koronare Arteriogenese zu induzieren. Die Funktionsfähigkeit des Modells wurde im Verlauf der letzten Jahre ausreichend belegt (58-62), so dass auf die zusätzliche Erhebung von Blutflussdaten mittels Mikrosphärenperfusion und μ-CT-Daten zum Nachweis von Kollateralgefäßwachstum verzichtet wurde. Die erhobenen Daten können also nur indirekt einen Hinweis auf die Beeinflussung der koronaren Arteriogenese geben.

Es existieren unterschiedliche koronare Arteriogenesemodelle beziehungsweise KHK-Modelle durch die in Großtieren, wie Schweinen koronare Arteriogenese induziert werden kann. Beispielsweise kann durch die Implantation eines Ameroid-Constrictors, der ein Gefäß langsam verschließt, oder auch durch die Implantation von flaschenhalsförmigen Stents, die Arteriogenese in kollateralen Umgehungskreisläufen induziert werden (76, 77).

Aufgrund der großen Variation des Okklusionsausmaßes benötigen diese Modelle jedoch eine hohe Tierzahl. Des Weiteren können diese Art von Okklusionen zu einer direkten myokardialen Ischämie führen, die dann angiogen und nicht arteriogen wirkt. Zudem sind sie nur schwer in Kleintieren durchführbar (76, 77).

Das Arteriogenesemodell der repetitiven Okklusion hat einige Vorteile. Zum einen die Durchführbarkeit in Nagern, also im Kleintier. Es existieren viele Proteine, die in der Ratte und dem Menschen ähnlich aufgebaut sind und der Arteriogeneseprozess in der Ratte kann in kurzer Zeit induziert werden. Daher bietet die Arbeit mit Arteriogenesemodellen in der Ratte die Möglichkeit entsprechende Versuche in kurzer Zeit und kosteneffektiv durchzuführen (78). Zum anderen besteht ein Vorteil des repetitiv-okklusiven Modells in der Anwendung eines standardisierten okklusiven Stimulus, d.h. jedes Versuchstier wird von Versuchsbeginn an dem gleichen Stimulus ausgesetzt (totale Okklusion der LAD) (79). Durch die standardisierte externe Kontrolle der Häufigkeit, der Dauer und des Ausmaßes der Okklusion der LAD liefert das Modell gut reproduzierbare Ergebnisse (80, 81).

5.1.1. Limitation des ROP

Es stellt sich die Frage, wie „realistisch“ das Modell die Situation eines KHK-Patienten simuliert: In dem Versuch wurde mit gesunden, 10-12 Wochen alten Sprague-Dawley-Ratten gearbeitet. Viele KHK-Patienten weisen aber koexistierende Erkrankungen auf, wie zum Beispiel das metabolische Syndrom oder einen arteriellen Hypertonus (34). So konnte in Nagetieren nachgewiesen werden, dass sowohl eine reine Hypercholesterolämie als auch ein metabolisches Syndrom zu stark vermindertem Kollateralwachstum führen und damit einen limitierenden Faktor für die Arteriogenese darstellen (82, 83). Eine Studie, die diese Tatsache unterstützt, belegte, dass if-Kanalblocker, wie Ivabradin, eine proarteriogene Wirkung nur bei Tieren mit hypercholesterolämischer Arteriosklerose, nicht aber im Wildtyp zeigten (84).
Im ROP-Modell müssen außerdem Probleme im Zusammenhang mit dem chirurgischen Eingriff beachtet werden, da es sich um einen Eingriff in Intubationsnarkose am offenen Thorax mit entsprechendem Trauma und folgender Entzündungsreaktion handelt (85).

5.1.2. Finaloperation und Infarktbestimmung

Im koronaren Arteriogenesemodell der Ratte erfolgte die Infarktgrößenbestimmung mit Hilfe der TTC-Färbung, nachdem die Tiere über 10 Tage das repetitiv-okklusive Protokoll erhalten hatten. Der 90-minütigen Infarktsetzung folgte eine 20-minütige Reperfusionsphase, an die sich die TTC-Infarktfärbung anschloss.
Obwohl die Infarkte der SHAM- und RANO-Gruppe doppelt so groß wie die der ROP-Gruppe waren, zeigte sich für die Ergebnisse keine Signifikanz.
Laut Kudoh *et al.* (1984) ergeben sich bei der Infarktbestimmung verschiedene Probleme (86). Das erste Problem stelle die große Variabilität der Koronargefäßanatomie der einzelnen Tiere dar, die zu einer großen Variationsbreite der Infarktvolumina führe. Um diese Variabilität zu minimieren sei es wichtig, nicht nur die Infarktgröße, sondern auch die „Area-at-risk“, also die minderperfundierte Region mitzubestimmen. Der Infarkt dürfe nicht auf das Gesamtventrikelvolumen, sondern müsse auf die „Area-at-risk“ bezogen werden (87). Dabei sei die Größe der „Area-at-risk“ direkt abhängig von dem Ausmaß der koronaren Kollateraldurchblutung (88). Evans *et al.* (1985) postulierten jedoch, dass die Variationsbreite der Infarktgröße bei

Ratten nur gering ausfalle. So wären 20 Tiere pro Gruppe nötig um eine Infarktgrößenvariation von 15 % zu beobachten (89). Greve *et al.* (1991) zeigten, dass im Gegensatz zu Modellen in Großtieren, wie Hunden, die „Area-at-risk“ Bestimmung in der Ratte weder mittels fluoreszierenden noch mit radioaktiv-markierten Mikrosphären zuverlässig funktionierte (88), so dass im ROP-Modell auf die Bestimmung der „Area-at-risk“ verzichtet wurde. Im Nachhinein betrachtet könnten der Verzicht auf die „Area-at-risk“ Bestimmung und die dadurch im ROP-Modell beobachtete große Infarktvariationsbreite, eine Ursache für die nicht signifikanten Infarktgrößenunterschiede zwischen SHAM- und ROP-Gruppe darstellen. Dies verdeutlicht, dass es in weiteren Versuchen sinnvoll wäre, sowohl die Infarktgröße als auch die „Area-at-risk“ zu bestimmen.

Für die reine Infarktmessung gibt es verschiedene Methoden. Es zeigte sich, dass die makroskopische Messung mittels TTC-Färbung kleinere Infarktvolumina als die mikroskopische Analyse hervorbringt. Beide Verfahren zeigten jedoch eine ausgeprägte Korrelation, so dass die TTC-Färbung als Screeningmethode empfohlen wurde (90). Bei der makroskopischen Infarktmessung gibt es zwei verschiedene Verfahren, die cut-weight-Methode und die volume-Methode, die keinen signifikanten Unterschied zeigen (90). Jedoch scheint die volume-Methode ein wenig genauer zu sein, weshalb diese, wie auch in anderen Studien, im ROP-Modell angewandt wurde.

Ein weiteres Problem laut Kudoh *et al.* (1984) entstehe durch das sogenannte „wave-front-Phenomen“ und die Wahl der Ischämiedauer. Ein Infarkt breite sich im Verlauf der Zeit vom Endokard hin zum Epikard aus. Das Epikard werde durch eine bessere Blutversorgung erst später nekrotisch. Damit werde ein Infarkt umso größer, je länger die Ischämiephase andauert (91). Bei Hunden liege diese Grenze bei 6 Stunden, vorher sei der Infarkt nicht vollständig ausgebildet. Zu einem früheren Zeitpunkt könne also nicht eindeutig geklärt werden, ob ein Medikament die Infarktgröße tatsächlich reduziere oder die Entwicklung eines Infarktes nur verzögere (92). Da sowohl die Herzfrequenz als auch die metabolische Rate bei Ratten 3-mal so schnell wie bei Hunden ist (58), läge danach die optimale Ischämiezeit in der Ratte bei 120 Minuten. Da in dieser Arbeit die medikamentöse Wirkung in einem koronaren Arteriogenesemodell evaluiert wurde und die letzte Medikamentenapplikation zwei Tage vor der Infarktsetzung erfolgte, reichte eine Ischämiephase von 90 Minuten aus.

5.2. EINFLUSSFAKTOREN AUF DIE INFARKTVOLUMINA

Auffällig war, dass sich die Gruppen sowohl im Gewicht als auch in Bezug auf die Herzfrequenzen unterschieden. Deshalb erfolgte eine Korrelationsanalyse zwischen den Gewichtsänderungen, sowie den Herzfrequenzen und der Infarktgröße, damit ein entsprechender Einfluss im ROP-Modell ausgeschlossen werden konnte.

Da bei allen Gruppen 1-mal täglich eine Gavage erfolgte, ist die Gewichtsdiskrepanz zwischen den Kontrollgruppen (ROP und SHAM) und den medikamentös-behandelten Gruppen nicht mit der Form der medikamentösen Verabreichung zu erklären. Für alle Medikamente sind gastrointestinale Störungen (Obstipation, Übelkeit) als Nebenwirkungen beschrieben. Bei Menschen treten unter der Einnahme von Verapamil und Ranolazin sogar in bis zu 10 Prozent der Fälle gastrointestinale Nebenwirkungen auf (44, 46). Das Auftreten gastrointestinaler Nebenwirkungen mit der Folge einer reduzierten Nahrungsaufnahme könnte also durchaus einen Grund für die starken Gewichtsunterschiede im repetitiv-okklusiven Modell darstellen.

Sowohl in Tierstudien (Kaninchen, Hunde) als auch Humanstudien zeigte sich ein positiver Effekt einer niedrigen Herzfrequenz auf das Kollateralwachstum (40, 93, 94). In der Studie von de Marchi *et al.* (2011) konnte in gesunden Probanden ein positiver Effekt einer niedrige Herzfrequenz auf die Kollateralgefäßdurchblutung nachgewiesen werden. Für Patienten, die eine ß-Blocker-Therapie erhielten, konnte diese Beobachtung aber nicht gemacht werden, d.h. durch Betablocker veränderte Kreislaufparameter hatten keinen Einfluss auf den Kollateralblutfluss (94). Dies würde die fehlende Korrelation zwischen Herzfrequenzabnahme unter Betablocker-Therapie und der Infarktgröße im koronaren Ateriogenesemodell erklären.

5.3. IMMUNHISTOLOGIE

Die immunhistochemische Färbung der Schnitte erfolgte zur Darstellung proliferierender Zellen mit einem Ki67-Antikörper. Zur Färbung von Monozyten wurde ein CD68-Antikörper verwendet.

Es wurden zunächst histologische Schnitte nach 10 Tagen ROP angefertigt, diese zeigten weder eine vermehrte Monozyteneinwanderung (CD68), noch eine vermehrte Proliferation (Ki67). Wir stellten die Hypothese auf, dass der Arteriogeneseprozess

nach 10 Tagen ROP bereits abgeschlossen sein könnte und der histologische Nachweis deshalb negativ ausfiele. Daraufhin wurden histologische Schnitte von Tieren angefertigt, die das ROP über 5 Tage durchlaufen hatten. Diese zeigten dann ein positives Ergebnis.

Die Tatsache, dass alle Gruppen eine vermehrte Proliferation und Monozyteneinwanderung im Bereich des Okkluders zeigten, ist am ehesten durch eine inflammatorische Reaktion auf den primären chirurgischen Eingriff zu erklären.

Dieser inflammatorische Prozess des umliegenden Gewebes könnte ursächlich dafür sein, dass sich zwischen den Gruppen kaum Unterschiede zeigten (85). Es stellte sich nämlich heraus, dass die Entzündungsreaktion eine starke unspezifische Färbung der LAD-Umgebung mit sich brachte, die die Auswertung der Schnitte erschwerte.

Bei der Anwendung des repetitiv-okklusiven Modells in Hunden konnte beobachtet werden, dass sich ein Effekt auf das Kollateralgefäßwachstum erst nach 3 Wochen feststellen ließ (81). So kann der Zeitpunkt der Schnittanfertigung nach 5 bzw. 10 Tagen ROP zu früh gewählt worden sein und es zeigten sich deshalb kaum Gruppenunterschiede. Dass sich allerdings in der ROP-Gruppe proliferierende Zellen, im Vergleich zu der SHAM-Gruppe, direkt an der Gefäßwand beobachten ließen, spricht für die Induktion zellulärer Proliferation in Folge des repetitiv-okklusiven Modells. Das vermehrte Vorkommen proliferierende Zellen in einem Tier der VERA-Gruppe bleibt fragwürdig. Da die Tieranzahl (n= 2) sehr klein war und diese Beobachtung bei sonst keinem weiteren Tier der medikamentös-behandelten Gruppen nachweisbar war, ist am ehesten von einem ″Ausreißer″ auszugehen.

Da die Analyse der histologischen Schnitte rein qualitativ erfolgte, um die Versuchstierzahl zu minimieren, wird für weitere Versuche eine quantitative Analyse vorgeschlagen.

5.4. MEDIKAMENTEN-EVALUATION

5.4.2. METOPROLOL

5.4.2.1. Infarktvolumen

Zum Einfluss von Metoprolol auf die Infarktgröße gibt es in der gängigen Literatur unterschiedliche Meinungen. Einerseits zeigten sowohl reine Infarkt- (95) als auch Infarkt-Reperfusionsmodelle (51, 52) in Sprague-Dawley-Ratten signifikant kleinere Infarktvolumina unter der Gabe von Metoprolol. Diese wiesen jedoch deutliche Unterschiede im Versuchsaufbau auf:
Bullock *et al.* (1985) setzten eine Ligatur der LAD über 4 oder 24 Stunden und die Infarktdarstellung erfolgte mittels H.E.-Färbung. Dabei zeigte sich unter Metoprolol nach 4 Stunden eine protektive Wirkung, die aber bereits nach 48 Stunden nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Die Medikamentenapplikation erfolgte i.v. 15 Minuten vor der Okklusion (95). Auch am isolierten Rattenherz zeigten Wang *et al.* (2007) bei einer 20-minütigen Ischämiephase mit anschließender 60-minütiger Reperfusionsphase kleinere Infarktvolumina unter Metoprololgabe. Es erfolgte dabei eine TTC-Färbung und das Infarktvolumen wurde auf das Gesamtventrikelvolumen bezogen. Die Medikamentenapplikation erfolgte i.v.10 Minuten vor Reperfusion (52). Ein ähnliches Ergebnis zeigten auch Zhu *et al.* (2006) in einem Infarkt-Reperfusionsmodell, bei dem einer 30-minütigen Ischämiephase eine 120-minütige Reperfusionsphase folgte. Die Infarktdarstellung erfolgte dabei mittels TTC und das Infarktvolumen wurde auf das Volumen der „Area-at-risk“ (Evans Blue-Färbung) bezogen. Die Medikamentenapplikation erfolgte dabei i.v. mit Beginn der Reperfusion (51). Wenn auch nicht signifikant, so zeigte auch die orale Applikation von Metoprolol 3 Tage und 1 Stunde vor Okklusion in einem Infarkt-Reperfusionsmodell im Hund bei 60-minütiger Ischämiephase durch Copper-coil-Technik und 90-minütiger Reperfusionsphase mittels Thrombolyse kleinere Infarktvolumina.
Die Infarktdarstellung erfolgte dabei mit Hilfe einer TTC-Färbung und wurde auf die „Area-at-risk“ bezogen (96).
Andererseits gibt es sowohl Tier- als auch Humanstudien, die keinen Einfluss von Metoprolol auf die Infarktgröße zeigten. In einem reinen Infarktmodell in Hunden mittels

Ligatur über 6 Stunden (97) und Katheterembolisation über 24 Stunden (86) konnte kein positiver Effekt für Metoprolol nachgewiesen werden. Die Infarktgröße wurde immer mittels TTC-Färbung erhoben und auf die „Area-at-risk“ (entweder mittels Szintigraphie oder Evans Blue-Färbung) bezogen. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch in reinen Infarkt- (98) und Infarkt-Reperfusionsmodellen (99) mittels Ballonkatheterembolisation an Schweinen. Dabei postulierten Kern *et al.* (1995), dass sich Metoprolol nur positiv auf die Infarktgröße auswirke, wenn bereits ein ausreichendes Kollateralgefäßsystem vorliege (98).

Auch in reinen Infarktmodellen an Sprague-Dawley-Ratten mittels 72-stündiger Ligatur der LAD und histologischer Infarktdarstellung zeigte sich kein Einfluss von Metoprolol auf die Infarktgröße. Die Tiere hatten dabei kurz nach der Ligatur zunächst über 24 Stunden Metoprolol i.p. erhalten, anschließend erfolgte die Gabe über das Trinkwasser (100).

Auch im koronaren Arteriogenesemodell zeigte die Applikation von Metoprolol keinen Effekt auf die Infarktgröße. Man kann schlussfolgern, dass die herzfrequenzsenkende Wirkung von Metoprolol, trotz verlängertem diastolischem koronaren Blutfluss, keinen Effekt auf die koronare Arteriogenese hat. Dies bestätigte auch die Korrelationsanalyse, die keinen Zusammenhang zwischen Herzfrequenz und Infarktgröße zeigte. In klinischen Studien zeigte die Anwendung von Betablockern einen negativen Effekt auf den Kollateralblutfluss (101). Ursache hierfür sei die periphere vasokonstriktive ß-Blockerwirkung, welche einen erhöhten Widerstand der Koronargefäße zur Folge hätte und damit eine verminderte Kollateralperfusion bedinge (101).

Die protektive Wirkung von Metoprolol scheint also eher auf einem durch Herzfrequenzsenkung bedingten verminderten Sauerstoffbedarf im akuten Infarkt, als auf einem positiven Einfluss auf die koronare Arteriogenese zu beruhen. Für eine genauere Analyse der Arteriogenese sind weitere *in vivo* Untersuchungen wie die Mikrosphärenperfusion zur Bestimmung des koronaren Blutflusses unter Metoprololgabe durchzuführen.

5.4.2.2. EKG-Daten

5.4.2.2.1. Herzfrequenz

Die in der Literatur beschriebene signifikante Abnahme der Herzfrequenz unter Metoprolol-Applikation (63, 97) zeigte sich auch im koronaren Arteriogenesemodell. Wie auch bereits von Maczewski *et al.* (2008) gezeigt, hat sich die Herzfrequenz 2 Tage nach Absetzen von Metoprolol wieder auf den Ausgangswert normalisiert.

5.4.2.2.2. R-Amplitudenverlust

Zum Einfluss von Metoprolol auf den R-Amplitudenverlust gibt es in der Literatur nur wenige Daten. So zeigten Herlitz *et al.* (1984) in einer Humanstudie, dass Patienten, die innerhalb von 12 Stunden nach Infarktsymptomatikbeginn Metoprolol erhielten, einen signifikant geringeren R-Amplitudenverlust als die Placebo-Gruppe aufwiesen. Bei einer späteren Gabe zeigte sich dieser Effekt nicht mehr (102). Im koronaren Arteriogenese-Modell zeigte Metoprolol keinen positiven Einfluss auf den R-Amplitudenverlust im Vergleich zur ROP-Gruppe, so dass man davon ausgehen kann, dass Metoprolol zwar im akuten Infarktstadium protektiv wirkt, jedoch keinen Einfluss auf das Kollateralgefäßwachstum hat. Das könnte auch erklären, warum sich der protektive Effekt von Metoprolol in vielen Studien zu einem späteren Zeitpunkt nicht mehr nachweisen lässt (95, 102).

5.4.2.2.3. ST-Streckenhebung

Überwiegend zeigten sowohl Tier- als Humanstudien einen positiven Effekt von Metoprolol auf die ST-Streckenhebung. So zeigten Herlitz *et al.* (1984) in der bereits erwähnten Humanstudie, dass unter Metoprolol die ST-Streckenhebung über den gesamten Beobachtungszeitraum signifikant kleiner als in der Placebogruppe ausfiel (102).

Auch Rønnevik *et al.* (1989) zeigten in einer Humanstudie, in der die Patienten innerhalb von 24 Stunden nach Infarktsymptomatikbeginn Metoprolol erhielten (zunächst i.v. als Bolus, dann über 14 Tage p.o.), in der anschließenden Ergometrieuntersuchung nach 15 Tagen eine signifikant geringere ST- Streckenhebung

(103). Anders als im koronaren Arteriogenesemodell wurden in den Humanstudien strenge Ausschlusskriterien (Herzfrequenz ≤ 65/min, Langzeittherapie mit Calciumantagonisten oder Betablockern usw.) angewandt, so dass dies einen Selektionsfehler darstellen könnte.
Auch in einem reinen Infarktmodell an Sprague-Dawley-Ratten zeigte sich unter einer 6-stündigen Ligatur der LAD und i.v. Applikation von Metoprolol 9 Minuten vor Okklusion eine signifikant geringe ST-Streckenhebung. Bei dem Modell erfolgte die Analyse der ST-Streckenhebung anders als im angewandten Versuchsaufbau nicht mittels der maximalen ST-Streckenhebung, sondern der durchschnittlichen ST-Streckenhebung im Verhältnis zur R-Amplitude (104).
Andererseits zeigte das bereits erwähnte reine Infarktmodell am Schwein von Kern *et al.* (1995) keinen positiven Einfluss von Metoprolol auf die ST-Streckenhebung (98).
Im koronaren Arteriogenesemodell zeigte Metoprolol auch auf das Ausmaß der ST-Streckenhebung keinen protektiven Effekt. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit dem fehlenden Einfluss auf die Infarktgröße im koronaren Arteriogenesemodell. Das unterstützt die Hypothese, dass die Herzfrequenzsenkung durch Metoprolol und die dadurch vermehrte diastolische koronare Durchblutung nicht ausreichend Scherkräfte generieren, um koronare Arteriogenese zu induzieren. Um dies zu bestätigen, müssten weitere *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen zur Abklärung des koronaren Blutflusses und der Scherkräfte erfolgen. Zu beachten ist außerdem, dass die strengen Studienausschlusskriterien bei den Humanstudien und die Tatsache, dass es sich hier um Patienten mit fortgeschrittener Arteriosklerose handelte, Gründe für die unterschiedlichen Ergebnisse im Vergleich zum koronaren Arteriogenesemodell sein könnten. Auch die unterschiedliche Auswertmethode der ST-Streckenhebung im Tiermodell könnte einen Grund für die Diskrepanz darstellen.

5.4.2.2.4. Herzrhythmusstörungen

In Bezug auf den Einfluss von Metoprolol auf Herzrhythmusstörungen gibt es in der Literatur unterschiedliche Ansichten. So zeigten Humanstudien wie die bereits erwähnte Studie von Rønnevik *et al.* (1989) ein vermindertes Auftreten von ventrikulären Extrasystolen und ventrikulären Tachykardien (103). Wenn auch ohne statistische Signifikanz, zeigte sich in einem reinen Infarktmodell in Katzen mit einer LAD-Ligatur über 2 Stunden eine Tendenz zum geringeren Auftreten von Herzrhythmusstörungen.

Jedoch zeigte sich in dieser Studie mit Hilfe der Mikrosphärenperfusion, dass die Metoprololgabe den Blutfluss in der ischämischen Region nicht steigerte (105).
Andere Tierstudien wie die von Bernauer *et al.* (1982) und Kern *et al.* (1995) zeigten keinen protektiven Effekt von Metoprolol auf das postinfarzielle Entstehen von Herzrhythmusstörungen. Auch Humanstudien, bei denen die Patienten nach einem i.v.-Bolus möglichst früh nach Symptombeginn täglich Metoprolol 200mg p.o. über 3 Monate bekamen, zeigten zwar einen protektiven Effekt für das Auftreten von Kammerflimmern, aber keinen Einfluss auf das Auftreten von ventrikulären Extrasystolen oder auf kurze Episoden ventrikulärer Tachykardien (106). Eine andere humane Studie mit ähnlichem Aufbau und gleicher Metoprololdosierung wie Ryden *et al.* (1983) zeigte, dass Metoprolol das Auftreten von Herzrhythmusstörungen pro Stunde, zwar nicht am 1. Tag reduzierte, jedoch nach 5 Tagen die Anzahl der Stunden mit schwerwiegenden Herzrhythmusstörungen (ventrikuläre Tachykardie, > 30 ventrikuläre Extrasystolen/h und R-auf-T-Phänomene) signifikant senkte (107). Das könnte ein Hinweis dafür sein, dass Tiermodelle, wie auch das koronare Arteriogenesemodell, zu kurze Beobachtungszeiträume untersuchen, um die protektive Wirkung von Metoprolol nachzuweisen.
Problematisch bei der Interpretation der Herzrhythmusstörungsdaten ist die Tatsache, dass es keine einheitliche Analysemethode gibt, so dass es kaum möglich ist, diese zu vergleichen. Interessant ist, dass sich im koronaren Arteriogenese-Modell bei der Hälfte der METO-Tiere Rhythmusstörungen im Grad 0 und bei der anderen Hälfte im Grad IVb nach Lown zeigte. Das könnte auch die These unterstützen, dass Metoprolol nur bei Tieren mit bereits gut ausgebildetem Kollateralgefäßsystem kardioprotektiv wirkt (98).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Metoprolol als selektiver ß1-Antagonist keinen protektiven Effekt im repetitiv-okklusiven Modell der Ratte zeigte. Die in der Literatur beobachtete kardioprotektive Wirkung scheint eher auf dem verminderten Sauerstoffbedarf im akuten Infarktgeschehen zu beruhen als auf der Induktion koronarer Arteriogenese. Für eine weitere Abklärung wären aber weitere *in vivo* Untersuchungen notwendig.

5.4.3. VERAPAMIL

5.4.3.1. Infarktvolumen

In der Literatur lässt sich in tierexperimentellen Studien eine überwiegend protektive Wirkung, d.h. kleinere Infarktvolumina, unter Verapamilgabe feststellen. Es handelt sich größtenteils um reine Infarkt- oder Infarkt-Reperfusionsmodelle in größeren Tieren wie Schweinen (108) und Hunden (109, 110), aber auch Nagern (53-55, 89). Der Versuchsaufbau der Studien war sehr unterschiedlich in Bezug auf Zeitpunkt der Medikamentenapplikation und -dosierung sowie der Dauer der Ischämie- und Reperfusionsphasen. So zeigten Reimer *et al.* (1985) (110), Lo *et al.* (1985) (109), Sandmann *et al.* (2001) (53) und Yui *et al.* (2011) (55), dass Verapamil die Infarktgröße nur reduziert, wenn es prä-okklusiv (5 Minuten bis 1 Stunde vor Infarktsetzung) verabreicht wird. Bei einer post-okklusiven Verabreichung oder bei Gabe in der Reperfusionsphase zeigte Verapamil keinen Effekt auf die Infarktgröße.
Lediglich Sandmann *et al.* (2001) verabreichten Wistar-Ratten in einem reinen Infarktmodell über 6 Wochen und 7 Tage prä-okklusiv oral Verapamil 8mg/kg KG/d. Verapamil. Evans *et al.* (1985) (89) und Yui *et al.* (2011) (55) stellten fest, dass die protektive Wirkung Verapamils zu dem von der Höhe der verabreichten Dosis abhängt. So zeigte die Verapamilapplikation in einem reinen Infarktmodell in Sprague-Dawley-Ratten erst ab einer Dosis von mindestens 10 mg/kg eine signifikante Reduktion der Infarktgröße, aber gleichzeitig auch eine erhöhte Sterblichkeit der Versuchstiere (89). Es scheinen also sowohl der Zeitpunkt der Applikation, die Dosierung und die Dauer der Ischämie entscheidend für die protektive Wirkung von Verapamil zu sein (55, 108). In verschiedenen Infarkt-Reperfusionsmodellen an Hunden konnte zudem festgestellt werden, dass die Verabreichung von Verapamil keinen Effekt auf den Kollateralblutfluss am Herzen zeigt (110, 111). Auch im koronaren Arteriogenesemodell zeigte Verapamil keinen Einfluss auf die Infarktgröße. Da in diesem Modell die orale Applikation von Verapamil 2 Tage prä-okklusiv abgesetzt wurde, scheinen die Ergebnisse im Einklang mit der gängigen Literatur zu stehen. So kann davon ausgegangen werden, dass die protektive Wirkung Verapamils nicht über einen positiven Effekt auf die koronare Arteriogenese oder einen erhöhten koronaren Kollateralblutfluss zu erklären ist. Die Gabe von Verapamil scheint in ausreichender Dosierung eher einen Einfluss auf das akute Infarktgeschehen zu haben. Das könnte auch erklären, warum die Gabe von

Verapamil in Humanstudien bisher weder eine Reduktion der Infarktgröße noch der Frühmortalität zeigte (112, 113). Für den Arteriogeneseprozess sind sowohl die durch Scherkräfte induzierte inflammatorische Reaktion (4, 12) als auch eine durch Calcium-getriggerte Endothel-induzierte Vasodilatation (114-116) von Bedeutung. So gibt es Studien, die zeigen, dass Verapamil sowohl die Freisetzung verschiedener Chemokine (IL-1β, TNF-α, IL-8 und IFN-γ) (117, 118) und damit die Aktivierung von Makrophagen und Monozyten, als auch die Lymphozytenmigration und -proliferation (119) hemmt.
Ursächlich für den fehlenden Einfluss von Verapamil auf die Infarktgröße im repetitiv-okklusiven Modell der Ratte könnte einerseits die Hemmung inflammatorischer Prozesse sein, andererseits der Eingriff in die Calciumhomöostase durch die Blockade von Calciumkanälen. Da diese Arbeit lediglich die Wirkung von Verapamil im repetitiv-okklusiven Modell evaluieren sollte, wurde auf weitere Untersuchungen verzichtet. Für eine genaue Ursachenabklärung müssten weitere *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen (Blutflussdaten, quantitative Histologie und nach Zellhomogenisierung durchgeführte FACS-Analyse) durchgeführt werden.

5.4.3.2. EKG-Daten

5.4.3.2.1. Herzfrequenz

Zum Einfluss von Verapamil auf die Herzfrequenz gibt es in der Literatur unterschiedliche Angaben. So zeigten Sandmann *et al.* (2001) in einem bereits erwähnten Modell eine Senkung der Herzfrequenz unter Verapamil. Andererseits zeigte sich in einem Infarkt-Reperfusionsmodell in Sprague-Dawley-Ratten unter Applikation von 5mg/kg 1 Stunde vor Okklusion kein Einfluss auf die Herzfrequenz (120). Im koronaren Arteriogenesemodell zeigte die orale Applikation von 7,5mg/kg keine Senkung der Herzfrequenz. Das könnte mit einem nicht-ausreichenden Wirkspiegel zusammenhängen. Für eine genaue Ursachenklärung müssten in weiteren Versuchen die Wirkspiegel im Blut bestimmt werden.

5.4.3.2.2. R-Amplitudenverlust

Im koronaren Arteriogenesemodell zeigte sich eine signifikante Abnahme der R-Amplitude im Vergleich zur ROP-Gruppe. Da der R-Amplitudenverlust ein indirektes Maß für die Infarktgröße ist (69), unterstützt dieses Ergebnis die Hypothese, dass Verapamil keinen protektiven Effekt im repetitiv-okklusiven Modell der Ratte zeigt. Da es bisher keine weitere Studie gibt, die den Einfluss von Verapamil auf die R-Amplitude untersucht hat, kann die im koronaren Arteriogenesemodell gemachte Beobachtung nicht mit anderen Studienergebnissen verglichen werden. Es stellt sich für zukünftige Versuche weiterhin die Frage, ob der fehlende protektive Effekt Verapamils im repetitiv-okklusiven Modell der Ratte auf einer Hemmung der Scherkraft induzierten Inflammation oder aber der Beeinflussung der intrazellulären Calciumhomöostase beruht.

5.4.3.2.3. ST-Hebung

In Bezug auf den Einfluss von Verapamil auf die ST-Hebung ist die Datenlage nicht eindeutig. Einerseits zeigte die Applikation von Verapamil in reinen Infarktmodellen an Hunden eine signifikante Senkung der ST-Hebung (121). In einem reinen Infarktmodell in Katzen dagegen zeigte Verapamil zwar eine verminderte Kreatinkinase-Erhöhung, aber keinen Einfluss auf die ST-Hebung (122). Auch in einem Infarktmodell an Spargue-Dawley-Ratten zeigte Verapamil erst ab Dosen von 2mg/kg, verabreicht kurz vor der Ligatur, einen Einfluss auf die ST-Hebung. In dieser Studie gingen hohe Verapamildosen mit einer erhöhten Sterblichkeit der Tiere einher (104).
Im koronaren Arteriogenesemodell zeigte Verapamil eine nicht-signifikante Tendenz zu einer erhöhten ST-Hebung, so dass die Ergebnisse im Einklang mit den gemachten Beobachtungen zur Infarktgröße und dem R-Amplitudenverlust stehen. Verapamil scheint auch hier keinen Einfluss auf die koronare Arteriogenese zu haben, sondern seine protektive Wirkung bei ausreichend hoher Dosierung im akuten Infarktgeschehen zu entfalten. Ein weiteres Problem, das sich auch schon bei den Infarktdaten abzeichnete, stellt die Tatsache dar, dass die Verapamildosis, die in einigen Versuchen notwendig war, um einen Effekt zu erzielen, mit einer erhöhten Sterblichkeit der Versuchstiere einherging (89, 104). Im repetitiv-okklusiven Modell der Ratte wurden Tiere, die während des Versuches starben, nicht mit in die Auswertung aufgenommen.

So könnte es sein, dass Tiere, die einen ausreichend hohen Wirkspiegel und damit einen Effekt auf die ST-Hebung aufwiesen, bei der Analyse der Daten nicht berücksichtigt wurden.

5.4.3.2.4. Herzrhythmusstörungen

In der Literatur ist ein überwiegend positiver Effekt von Verapamil auf das Auftreten von Herzrhythmusstörungen beschrieben. So zeigten verschiedene Infarkt- und Infarkt-Reperfusionsmodelle in Nagern ein geringeres Auftreten von Herzrhythmusstörungen unter der Gabe von Verapamil (53-55, 104, 123).
Auch hier konnten Johnston *et al.* (1983) die positive Wirkung von Verapamil erst unter hohen Dosen (20mg/kg i.v.) nachweisen. Dabei haben alle diese Studien nicht den Grad der Rhythmusstörung beachtet, sondern lediglich die Häufigkeit analysiert. Yui *et al.* (2011) analysierten außerdem nicht das Auftreten nach Infarktsetzung, sondern die Häufigkeit von Herzrhythmusstörungen nach Beginn der Reperfusion.
Im koronaren Arteriogenesemodell, in dem nicht die Häufigkeit der Herzrhythmusstörungen, sondern der Grad der Rhythmusstörung nach Lown analysiert wurde, zeigte die Verapamil-Gruppe ein häufigeres Vorliegen von hochgradigen Herzrhythmusstörungen im Vergleich zur ROP-Gruppe. Dieses Ergebnis unterstützt die im repetitiv-okklusiven Modell erhobenen Daten zur Infarktgröße, Ausmaß der ST-Hebung und dem R-Amplitudenverlust der VERA-Gruppe. Es wird erneut deutlich, dass Verapamil im koronaren Arteriogenesemodell keinen protektiven Effekt zeigt und seine kardioprotektive Wirkung auf das akute Infarktgeschehen beschränkt zu sein scheint. Die unterschiedlichen Tiermodelle, Auswertungstechniken und die unterschiedliche Dauer der Ischämie- und Reperfusionsphasen erschweren es jedoch zusätzlich, die unterschiedlichen Studienergebnisse mit den im repetitiv-okklusiven Modell erhobenen Ergebnissen zu vergleichen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Verapamil als direkter Calciumantagonist keinen protektiven Effekt, gerade in Bezug auf das Auftreten von Herzrhythmusstörungen, im repetitiv-okklusiven Modell der Ratte zeigte. Dies könnte am ehesten auf einer Hemmung des durch Scherkräfte induzierten inflammatorischen Prozesses (118, 119) oder dem Einfluss auf die Calciumhomöostase beruhen. Zur genaueren Ursachenabklärung wären weitere *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen nötig.

5.4.1. RANOLAZIN

5.4.1.1. Infarktvolumen

In der Literatur zeigten die überwiegenden *in vivo* Studien (sowohl Tier- als auch Humanstudien) einen protektiven Effekt von Ranolazin auf das ischämische Herz (56, 57, 124, 125). Dabei handelte es sich bei den tierexperimentellen Studien ausschließlich um reine Infarkt- oder Infarkt-Reperfusionsmodelle.
So zeigten beispielsweise Sprague-Dawley-Ratten in Infarkt-Reperfusions-Modellen signifikant kleinere Infarktvolumina unter Ranolazin-Gabe (126, 127).
Nur in einem auch 90-minütigen Ischämie-Reperfusionsmodell am Hund konnte für Ranolazin kein positiver Effekt auf die Infarktgröße nachgewiesen werden (128).
Anzumerken ist aber, dass alle Studien reine Infarkt-Reperfusionsmodelle waren, bei denen Ranolazin frühestens 21 Minuten vor Infarktsetzung als Bolus und dann als weitere Infusion während der Reperfusion appliziert wurde. D.h. sowohl die Medikamentenapplikation (per os vs. i.v.-Gabe), als auch die zeitliche Dauer von Infarktsetzung (90 Min vs. 5 Min) und Reperfusion (20 Min vs.5 Min) waren unterschiedlich. Im Vergleich zum Modell der repetitiven Okklusion untersuchten die Studien also ausschließlich den Einfluss von Ranolazin auf das akute Infarktgeschehen.
In den Studien erfolgte außerdem zusätzlich die Bestimmung der Area at risk (nekrotisches als auch ischämisches Areal) und die ermittelte Infarktgröße wurde dann gewichtsadaptiert auf diese bezogen oder es wurde zur Infarktgrößenbestimmung die cut-weigh-Methode anstelle der volume-Methode verwendet. Außerdem definierten Kloner *et al.* (2011) eine „Area-at-risk“ < 10 % als Ausschlusskriterium, welches einen wichtigen Selektionsfaktor darstellt, der im koronaren Arteriogenesemodell keine Anwendung fand. Bei diesen Studien unterschieden sich die Modelle, Messmethoden und Ausschlusskriterien also entscheidend von denen, die im koronaren Arteriogenesemodell angewandt wurden und könnten damit einen entscheidenden Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse darstellen.
Im koronaren Arteriogenesemodell hingegen zeigte die Ranolazin-Gruppe im Vergleich zur ROP-Gruppe doppelt so große durchschnittliche Infarktvolumina. Daher könnte man zwar davon ausgehen, dass Ranolazin im akuten Infarktgeschehen durch die Hemmung eines Calcium-Overloads kardioprotektiv wirkt (56, 127). Calcium ist aber sowohl entscheidend für die Zellproliferation (129) als auch die Arteriogenese (114). So

wurden vor einiger Zeit mechanosensitive Calcium-Kanäle, die transienten receptor potential ion channels (sog.TRP) entdeckt (130, 131). Die Aktivierung einiger dieser Kanäle erfolgt durch vermehrte Scherkräfte (130) und bedingt einen andauernden Calciumeinstrom in die Zelle (115, 116). Dieser extrazelluläre Calciumeinstrom (130) ist bedeutend für die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen (132) und die Endothel-induzierte Vasodilatation (115), welche entscheidend für die Migration von Monozyten sein soll (16).
Der durch die Ranolazinapplikation bedingte Eingriff in die Calciumhomöostase der Zelle könnte also einen Grund dafür darstellen, dass Ranolazin diesen protektiven Effekt im repetitiv-okklusiven Modell nicht gezeigt hat.

5.4.1.2. EKG-Daten

5.4.1.2.1. Herzfrequenz

Wie auch in der sonstigen Literatur (sowohl in Tier- als auch Humanstudien) zeigte sich unter Ranolazingabe kein signifikanter Einfluss auf die Herzfrequenz (46, 124).

5.4.1.2.2. R-Amplitudenverlust

Die Einnahme von Ranolazin zeigte im koronaren Arteriogenesemodell keinen Einfluss auf den R-Amplitudenverlust. Da der R-Amplitudenverlust ein indirektes Zeichen für das Infarktausmaß ist (69), decken sich die Beobachtungen mit der Tendenz zu größeren Infarktvolumina und der signifikanten Erhöhung der ST-Strecke unter Ranolazineinnahme im Vergleich zur ROP-Gruppe. Der fehlende Einfluss auf die R-Amplitude unter Ranolazin unterstützt also die fehlende protektive Wirkung im koronaren Arteriogenesemodell. Auch hier könnte der Ranolazin bedingte Eingriff in die Calciumhomöostase ursächlich sein. Da der Einfluss von Ranolazin auf die R-Amplitude bisher in noch keiner anderen Studie untersucht wurde, können die Ergebnisse nicht weiter verglichen werden.

5.4.1.2.3. ST-Streckenhebung

Zum Einfluss von Ranolazin auf die ST-Streckenhebung gibt es in der Literatur unterschiedliche Meinungen. So zeigten beispielsweise Chi *et al.* (2013) in einem reinen Infarkt-Modell am Hund eine signifikant niedrigere ST-Streckenhebung unter Ranolazin. In dem Modell wurden jedoch zeitgleich die LAD und der Ramus circumflexus ligiert und die Herzfrequenz mittels Pacer für 5 Minuten kontrolliert. Anschließend erfolgte die halbstündige i.v. Applikation von Ranolazin (Bolus: 0,1mg/kg, anschließend: 0,03mg/kg/min) (133).

In der Studie von Black *et al.* (1994) zeigte das Ischämie-Reperfusionsmodell im Hund weder einen positiven noch negativen Effekt auf die ST-Streckenhebung. In dem Versuchsaufbau folgte einer 90-minütigen Okklusion der LAD eine 18-stündige Reperfusionsphase. Die Tiere hatten 30 Minuten vor Infarktsetzung Ranolazin i.v. erhalten (128). Bei beiden Studien handelte es sich um reine Infarkt- oder Infarkt-Reperfusionsmodelle, die ausschließlich die Ranolazinwirkung im akuten Infarkt untersuchten. Sie unterschieden sich im Versuchsaufbau, der Versuchstierart, dem Zeitpunkt der letzten Medikamentenapplikation und der Dauer der Ischämie- und Reperfusionsphase deutlich vom repetitiv-okklusiven Modell.

Im koronaren Arteriogenesemodell zeigte Ranolazin eine signifikante Erhöhung der ST-Streckenhebung. Da in klinischen Studien eine ST-Hebung ≥ 0,1mV bei 1-minütiger Koronargefäßokklusion mit einer hohen Mortalität und einem geringen Kollateralblutfluss einhergehen (68), steht dieses Ergebnis im Einklang mit der Tendenz, die Infarktvolumina im Vergleich zur ROP-Gruppe zu erhöhen. Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, dass die Gabe von Ranolazin über den Eingriff in die Calciumhomöostase zwar im akuten Infarkt protektiv wirkt (56, 127), die koronare Arteriogenese jedoch eher negativ beeinflusst.

Die im repetitiv-okklusiven Modell beobachtete ST-Streckenhebung unter Ranolazin im Vergleich zu den Ergebnissen im reinen Infarkt- und Infarkt-Reperfusions-Modell könnte also einerseits auf den methodischen Unterschieden der Studien beruhen. Andererseits könnte dies auch die Hypothese unterstützen, dass Ranolazin durch den Eingriff in die Calciumhomöostase die koronare Arteriogenese hemmt.

5.4.1.2.4. Herzrhythmusstörungen

Ex vivo Studien an isolierten Fisher344-Rattenherzen, bei denen der I_{NA-L}- Kanal selektiv mittels GS967 blockiert wurde, zeigten ein signifikant geringeres Auftreten von Herzrhythmusstörungen nachdem die Herzen mit Akonitin (50µg) oder 0,1mM Wasserstoffperoxid perfundiert worden waren. Dabei wurde für die Definition der Herzrhythmusstörungen nicht die Lown-Klassifikation, sondern lediglich das Auftreten/Nicht-Auftreten von ventrikulären Tachykardien und Kammerflimmern ausgewertet (134).
Auch die bereits oben näher erläuterten *in vivo* Studien an Sprague-Dawley-Ratten von Dhalla *et al.* (2009) und Kloner *et al.* (2011) zeigten ein signifikant geringeres Auftreten von Herzrhythmusstörungen unter Ranolazingabe. Als relevante Rhythmusstörung war dort das Auftreten von ≥ 3 abnormalen Schlägen bzw. ventrikuläre Tachykardien, die länger als 10 Sekunden anhielten, definiert.
Der in der Literatur beschriebene kardioprotektive Effekt von Ranolazin zeigte sich im koronaren Arteriogenesemodell nicht. Stattdessen zeigte die RANO-Gruppe sogar eine Tendenz zu höhergradigen Herzrhythmusstörungen. Neben der unterschiedlichen Definition für das Vorliegen von Herzrhythmusstörungen und dem Zeitpunkt der Medikamentenapplikation könnten die Ergebnisse darauf hindeuten, dass die Einnahme von Ranolazin zwar unmittelbar einen protektiven Effekt zeigt (134, 135), es die koronare Arteriogenese jedoch wenig bis negativ beeinflusst. Das könnte auch erklären, warum in Doppelblind-Studien an Menschen mit Nicht-ST-Hebungsinfarkten, die die erste Ranolazin-Dosis kurz vor der Reperfusion mittels PCI erhielten, zwar innerhalb der ersten 7 Tage nach dem Eingriff seltener Herzrhythmusstörungen auftraten, sich aber kein positiver Einfluss auf die Gesamtsterblichkeitsrate und das Auftreten von Re-Infarkten zeigte (136, 137).

Zusammenfassend lässt sich für Ranolazin keine protektive Wirkung im repetitiven Okklusionsmodell der Ratte feststellen. Insbesondere die Infarktvolumengröße und der Grad der Herzrhythmusstörungen in der Ranolazin-Gruppe zeigten sogar eher einen negativen Effekt im koronaren Arteriogenesemodell. Ursächlich hierfür ist am ehesten der Eingriff in die intrazelluläre Calciumhomöostase. Für eine genaue Ursachenabklärung müssten aber weitere Untersuchungen erfolgen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Lutter G, Quaden R, Cremer J. Biological bypass in cardiovascular surgery. The Thoracic and cardiovascular surgeon. 2004;52(4):237-48.

2. Troidl K, Schaper W. Arteriogenesis versus angiogenesis in peripheral artery disease. Diabetes/metabolism research and reviews. 2012;28 Suppl 1:27-9.

3. Fulton WF. ARTERIAL ANASTOMOSES IN THE CORONARY CIRCULATION. II. DISTRIBUTION, ENUMERATION AND MEASUREMENT OF CORONARY ARTERIAL ANASTOMOSES IN HEALTH AND DISEASE. Scottish medical journal. 1963;8:466-74.

4. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. Nature medicine. 2000;6(4):389-95.

5. Schaper W. Introduction. In: Schaper W, Schaper J, editors. Arteriogenesis. Boston: Kluwer Academic Publishers; 2004. p. 2-4.

6. Buschmann I, Schaper W. Arteriogenesis Versus Angiogenesis: Two Mechanisms of Vessel Growth. News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society. 1999;14:121-5.

7. Buschmann I, Pries A, Styp-Rekowska B, Hillmeister P, Loufrani L, Henrion D, Shi Y, Duelsner A, Hoefer I, Gatzke N, Wang H, Lehmann K, Ulm L, Ritter Z, Hauff P, Hlushchuk R, Djonov V, van Veen T, le Noble F. Pulsatile shear and Gja5 modulate arterial identity and remodeling events during flow-driven arteriogenesis. Development (Cambridge, England). 2010;137(13):2187-96.

8. Pipp F, Boehm S, Cai WJ, Adili F, Ziegler B, Karanovic G, Ritter R, Balzer J, Scheler C, Schaper W, Schmitz-Rixen T. Elevated fluid shear stress enhances postocclusive collateral artery growth and gene expression in the pig hind limb. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2004;24(9):1664-8.

9. Deindl E, Buschmann I, Hoefer IE, Podzuweit T, Boengler K, Vogel S, van Royen N, Fernandez B, Schaper W. Role of ischemia and of hypoxia-inducible genes in arteriogenesis after femoral artery occlusion in the rabbit. Circulation research. 2001;89(9):779-86.

10. Eitenmuller I, Volger O, Kluge A, Troidl K, Barancik M, Cai WJ, Heil M, Pipp F, Fischer S, Horrevoets AJ, Schmitz-Rixen T, Schaper W. The range of adaptation by collateral vessels after femoral artery occlusion. Circulation research. 2006;99(6):656-62.

11. Scholz D, Ziegelhoeffer T, Helisch A, Wagner S, Friedrich C, Podzuweit T, Schaper W. Contribution of arteriogenesis and angiogenesis to postocclusive hindlimb perfusion in mice. Journal of molecular and cellular cardiology. 2002;34(7):775-87.

12. Heil M, Ziegelhoeffer T, Wagner S, Fernandez B, Helisch A, Martin S, Tribulova S, Kuziel WA, Bachmann G, Schaper W. Collateral artery growth (arteriogenesis) after experimental arterial occlusion is impaired in mice lacking CC-chemokine receptor-2. Circulation research. 2004;94(5):671-7.

13. Hoefer IE, van Royen N, Rectenwald JE, Deindl E, Hua J, Jost M, Grundmann S, Voskuil M, Ozaki CK, Piek JJ, Buschmann IR. Arteriogenesis proceeds via ICAM-1/Mac-1- mediated mechanisms. Circulation research. 2004;94(9):1179-85.

14. Meier P, Schirmer SH, Lansky AJ, Timmis A, Pitt B, Seiler C. The collateral circulation of the heart. BMC medicine. 2013;11:143.

15. Dai X, Faber JE. Endothelial nitric oxide synthase deficiency causes collateral vessel rarefaction and impairs activation of a cell cycle gene network during arteriogenesis. Circulation research. 2010;106(12):1870-81.

16. Sager HB, Middendorff R, Rauche K, Weil J, Lieb W, Schunkert H, Ito WD. Temporal patterns of blood flow and nitric oxide synthase expression affect macrophage accumulation and proliferation during collateral growth. Journal of angiogenesis research. 2010;2:18.

17. Schaper W. Introduction. In: Schaper W, Schaper J, editors. Boston: Kluwer Academic Publishers; 2004. p. 7-8.

18. Buschmann IR, Hoefer IE, van Royen N, Katzer E, Braun-Dulleaus R, Heil M, Kostin S, Bode C, Schaper W. GM-CSF: a strong arteriogenic factor acting by amplification of monocyte function. Atherosclerosis. 2001;159(2):343-56.

19. Arras M, Ito WD, Scholz D, Winkler B, Schaper J, Schaper W. Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. The Journal of clinical investigation. 1998;101(1):40-50.

20. Troidl C, Jung G, Troidl K, Hoffmann J, Mollmann H, Nef H, Schaper W, Hamm CW, Schmitz-Rixen T. The temporal and spatial distribution of macrophage subpopulations during arteriogenesis. Current vascular pharmacology. 2013;11(1):5-12.

21. Hoefer IE, van Royen N, Rectenwald JE, Bray EJ, Abouhamze Z, Moldawer LL, Voskuil M, Piek JJ, Buschmann IR, Ozaki CK. Direct evidence for tumor necrosis factor-alpha signaling in arteriogenesis. Circulation. 2002;105(14):1639-41.

22. Cai W, Vosschulte R, Afsah-Hedjri A, Koltai S, Kocsis E, Scholz D, Kostin S, Schaper W, Schaper J. Altered balance between extracellular proteolysis and

antiproteolysis is associated with adaptive coronary arteriogenesis. Journal of molecular and cellular cardiology. 2000;32(6):997-1011.

23. Schaper W, Pipp F, Scholz D, Boehm S, Deindl E, Barancik M, Eitenmuller I, Ziegelhoeffer T, Kluge A, Schmitz-Rixen T. Physical Forces and their Translation into Molecular Mechanisms. In: Schaper W, Schaper J, editors. Arteriogenesis. Boston: Kluwer Academic Publishers; 2004. p. 95-6.

24. Vogel S, Kubin T, Barancik M, Deindl E, von der Ahe D, Zimmermann R. Signal Transduction Pathways in Smooth Muscle Cells. In: Schaper W, Schaper J, editors. Arteriogenesis. Boston: Kluwer Academic Publishers; 2004. p. 213.

25. Seiler C, Fleisch M, Meier B. Direct intracoronary evidence of collateral steal in humans. Circulation. 1997;96(12):4261-7.

26. Meier P, Indermuehle A, Pitt B, Traupe T, de Marchi SF, Crake T, Knapp G, Lansky AJ, Seiler C. Coronary collaterals and risk for restenosis after percutaneous coronary interventions: a meta-analysis. BMC medicine. 2012;10:62.

27. Elsman P, van 't Hof AW, de Boer MJ, Hoorntje JC, Suryapranata H, Dambrink JH, Zijlstra F. Role of collateral circulation in the acute phase of ST-segment-elevation myocardial infarction treated with primary coronary intervention. European heart journal. 2004;25(10):854-8.

28. Habib GB, Heibig J, Forman SA, Brown BG, Roberts R, Terrin ML, Bolli R. Influence of coronary collateral vessels on myocardial infarct size in humans. Results of phase I thrombolysis in myocardial infarction (TIMI) trial. The TIMI Investigators. Circulation. 1991;83(3):739-46.

29. Sorajja P, Gersh BJ, Mehran R, Lansky AJ, Krucoff MW, Webb J, Cox DA, Brodie BR, Stone GW. Impact of collateral flow on myocardial reperfusion and infarct size in patients undergoing primary angioplasty for acute myocardial infarction. American heart journal. 2007;154(2):379-84.

30. Billinger M, Kloos P, Eberli FR, Windecker S, Meier B, Seiler C. Physiologically assessed coronary collateral flow and adverse cardiac ischemic events: a follow-up study in 403 patients with coronary artery disease. Journal of the American College of Cardiology. 2002;40(9):1545-50.

31. Hansen JF. Coronary collateral circulation: clinical significance and influence on survival in patients with coronary artery occlusion. American heart journal. 1989;117(2):290-5.

32. Meier P, Gloekler S, Zbinden R, Beckh S, de Marchi SF, Zbinden S, Wustmann K, Billinger M, Vogel R, Cook S, Wenaweser P, Togni M, Windecker S, Meier B, Seiler C. Beneficial effect of recruitable collaterals: a 10-year follow-up study in patients with

stable coronary artery disease undergoing quantitative collateral measurements. Circulation. 2007;116(9):975-83.

33. Statistisches Bundesamt (2013). Die 10 häufigsten Todesursachen: https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/HaeufigsteTodesursachen.html Wiesbaden 2013 (Cited: 30.06.2015).

34. Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). Nationale VersorgungsLeitlinien Chronische KHK - Langfassung 2014. 3.Auflage. Version 1. 2014.:[Available from: http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/nvl-004l_S3_KHK_2015-04.pdf; (Cited: 30.06.2015) DOI:10.6101/AZQ/000217.

35. Task Force M, Montalescot G, Sechtem U, Achenbach S, Andreotti F, Arden C, Budaj A, Bugiardini R, Crea F, Cuisset T, Di Mario C, Ferreira JR, Gersh BJ, Gitt AK, Hulot JS, Marx N, Opie LH, Pfisterer M, Prescott E, Ruschitzka F, Sabate M, Senior R, Taggart DP, van der Wall EE, Vrints CJ, Guidelines ESCCfP, Zamorano JL, Achenbach S, Baumgartner H, Bax JJ, Bueno H, Dean V, Deaton C, Erol C, Fagard R, Ferrari R, Hasdai D, Hoes AW, Kirchhof P, Knuuti J, Kolh P, Lancellotti P, Linhart A, Nihoyannopoulos P, Piepoli MF, Ponikowski P, Sirnes PA, Tamargo JL, Tendera M, Torbicki A, Wijns W, Windecker S, Document R, Knuuti J, Valgimigli M, Bueno H, Claeys MJ, Donner-Banzhoff N, Erol C, Frank H, Funck-Brentano C, Gaemperli O, Gonzalez-Juanatey JR, Hamilos M, Hasdai D, Husted S, James SK, Kervinen K, Kolh P, Kristensen SD, Lancellotti P, Maggioni AP, Piepoli MF, Pries AR, Romeo F, Ryden L, Simoons ML, Sirnes PA, Steg PG, Timmis A, Wijns W, Windecker S, Yildirir A, Zamorano JL. 2013 ESC guidelines on the management of stable coronary artery disease: the Task Force on the management of stable coronary artery disease of the European Society of Cardiology. European heart journal. 2013;34(38):2949-3003.

36. Zbinden S, Zbinden R, Meier P, Windecker S, Seiler C. Safety and efficacy of subcutaneous-only granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for collateral growth promotion in patients with coronary artery disease. Journal of the American College of Cardiology. 2005;46(9):1636-42.

37. Hoefer IE, Grundmann S, Schirmer S, van Royen N, Meder B, Bode C, Piek JJ, Buschmann IR. Aspirin, but not clopidogrel, reduces collateral conductance in a rabbit model of femoral artery occlusion. Journal of the American College of Cardiology. 2005;46(6):994-1001.

38. Duelsner A, Gatzke N, Glaser J, Hillmeister P, Li M, Lee EJ, Lehmann K, Urban D, Meyborg H, Stawowy P, Busjahn A, Nagorka S, Persson AB, Buschmann IR. Acetylsalicylic acid, but not clopidogrel, inhibits therapeutically induced cerebral arteriogenesis in the hypoperfused rat brain. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism. 2012;32(1):105-14.

39. Karow T, Lang-Roth R. Kardiovaskuläre Pharmaka- Betablocker. In: Karow T, editor. Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 21.Auflage. Pulheim: Thomas Karow; 2012. p. 85-8.

40. Lamping KG, Zheng W, Xing D, Christensen LP, Martins J, Tomanek RJ. Bradycardia stimulates vascular growth during gradual coronary occlusion. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2005;25(10):2122-7.

41. Dahlof B, Lindholm LH, Hansson L, Schersten B, Ekbom T, Wester PO. Morbidity and mortality in the Swedish Trial in Old Patients with Hypertension (STOP-Hypertension). Lancet (London, England). 1991;338(8778):1281-5.

42. Messerli FH, Grossman E, Goldbourt U. Are beta-blockers efficacious as first-line therapy for hypertension in the elderly? A systematic review. Jama. 1998;279(23):1903-7.

43. Gottlieb SS, McCarter RJ, Vogel RA. Effect of beta-blockade on mortality among high-risk and low-risk patients after myocardial infarction. The New England journal of medicine. 1998;339(8):489-97.

44. Karow T, Lang-Roth R. Kardiovaskuläre Pharmaka- Calcium-Antagonisten. In: Karow T, editor. Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 21. Auflage. Pulheim: Thomas Karow; 2012. p. 127-33.

45. McCormack JG, Barr RL, Wolff AA, Lopaschuk GD. Ranolazine stimulates glucose oxidation in normoxic, ischemic, and reperfused ischemic rat hearts. Circulation. 1996;93(1):135-42.

46. Karow T, Lang-Roth R. kardiovaskuläre Pharmaka-Ranolazin. In: Karow T, editor. Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 21. Pulheim: Thomas Karow; 2012. p. 111.

47. Imahashi K, Kusuoka H, Hashimoto K, Yoshioka J, Yamaguchi H, Nishimura T. Intracellular sodium accumulation during ischemia as the substrate for reperfusion injury. Circulation research. 1999;84(12):1401-6.

48. Ju YK, Saint DA, Gage PW. Hypoxia increases persistent sodium current in rat ventricular myocytes. The Journal of physiology. 1996;497 (Pt 2):337-47.

49. Noble D, Noble PJ. Late sodium current in the pathophysiology of cardiovascular disease: consequences of sodium-calcium overload. Heart (British Cardiac Society). 2006;92 Suppl 4:iv1-iv5.

50. Hawwa N, Menon V. Ranolazine: clinical applications and therapeutic basis. American journal of cardiovascular drugs : drugs, devices, and other interventions. 2013;13(1):5-16.

51. Zhu BQ, Simonis U, Cecchini G, Zhou HZ, Li L, Teerlink JR, Karliner JS. Comparison of pyrroloquinoline quinone and/or metoprolol on myocardial infarct size and mitochondrial damage in a rat model of ischemia/reperfusion injury. Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics. 2006;11(2):119-28.

52. Wang P, Zaragoza C, Holman W. Sodium-hydrogen exchange inhibition and beta-blockade additively decrease infarct size. The Annals of thoracic surgery. 2007;83(3):1121-7.

53. Sandmann S, Claas R, Cleutjens JP, Daemen MJ, Unger T. Calcium channel blockade limits cardiac remodeling and improves cardiac function in myocardial infarction-induced heart failure in rats. Journal of cardiovascular pharmacology. 2001;37(1):64-77.

54. Liu CN, Yang C, Liu XY, Li S. In vivo protective effects of urocortin on ischemia-reperfusion injury in rat heart via free radical mechanisms. Canadian journal of physiology and pharmacology. 2005;83(6):459-65.

55. Yui H, Imaizumi U, Beppu H, Ito M, Furuya M, Arisaka H, Yoshida K. Comparative effects of verapamil, nicardipine, and nitroglycerin on myocardial ischemia/reperfusion injury. Anesthesiology research and practice. 2011;2011:521084.

56. Hale SL, Leeka JA, Kloner RA. Improved left ventricular function and reduced necrosis after myocardial ischemia/reperfusion in rabbits treated with ranolazine, an inhibitor of the late sodium channel. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. 2006;318(1):418-23.

57. Letienne R, Bel L, Bessac AM, Vacher B, Le Grand B. Myocardial protection by F 15845, a persistent sodium current blocker, in an ischemia-reperfusion model in the pig. European journal of pharmacology. 2009;624(1-3):16-22.

58. Toyota E, Warltier DC, Brock T, Ritman E, Kolz C, O'Malley P, Rocic P, Focardi M, Chilian WM. Vascular endothelial growth factor is required for coronary collateral growth in the rat. Circulation. 2005;112(14):2108-13.

59. Toyota E, Kawaguchi Y, Ogasawara Y, Watanabe N, Neishi Y, Kawamoto T, Okura H, Yoshida K. Novel rat model of ischemic cardiomyopathy induced by repetitive myocardial ischemia/reperfusion injury while conscious. Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society. 2007;71(5):788-95.

60. Carrao AC, Chilian WM, Yun J, Kolz C, Rocic P, Lehmann K, van den Wijngaard JP, van Horssen P, Spaan JA, Ohanyan V, Pung YF, Buschmann I. Stimulation of coronary collateral growth by granulocyte stimulating factor: role of reactive oxygen species. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2009;29(11):1817-22.

61. Pung YF, Sam WJ, Stevanov K, Enrick M, Chen CL, Kolz C, Thakker P, Hardwick JP, Chen YR, Dyck JR, Yin L, Chilian WM. Mitochondrial oxidative stress

corrupts coronary collateral growth by activating adenosine monophosphate activated kinase-alpha signaling. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2013;33(8):1911-9.

62. Pung YF, Rocic P, Murphy MP, Smith RA, Hafemeister J, Ohanyan V, Guarini G, Yin L, Chilian WM. Resolution of mitochondrial oxidative stress rescues coronary collateral growth in Zucker obese fatty rats. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2012;32(2):325-34.

63. Maczewski M, Mackiewicz U. Effect of metoprolol and ivabradine on left ventricular remodelling and Ca2+ handling in the post-infarction rat heart. Cardiovascular research. 2008;79(1):42-51.

64. Richter A, Ungemach FR. Dosierungsangaben und -berechnungen. In: Löscher W, Richter A, Potschka H, editors. Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren. 9.Auflage. Stuttgart: Enke-Verlag; 2014. p. 593-7.

65. Jestaedt R, Sandritter W. [Experiences with the TTC-(triphenyltetrazolium chloride-) reaction for the pathological-anatomical diagnosis of fresh myocardial infarct]. Zeitschrift fur Kreislaufforschung. 1959;48:802-9.

66. Liszczak TM, Hedley-Whyte ET, Adams JF, Han DH, Kolluri VS, Vacanti FX, Heros RC, Zervas NT. Limitations of tetrazolium salts in delineating infarcted brain. Acta neuropathologica. 1984;65(2):150-7.

67. Lundy EF, Solik BS, Frank RS, Lacy PS, Combs DJ, Zelenock GB, D'Alecy LG. Morphometric evaluation of brain infarcts in rats and gerbils. Journal of pharmacological methods. 1986;16(3):201-14.

68. de Marchi SF, Streuli S, Haefeli P, Gloekler S, Traupe T, Warncke C, Rimoldi SF, Stortecky S, Steck H, Seiler C. Determinants of prognostically relevant intracoronary electrocardiogram ST-segment shift during coronary balloon occlusion. The American journal of cardiology. 2012;110(9):1234-9.

69. Herlitz J, Hjalmarson A, Waldenstrom J. Relationship between electrocardiographically and enzymatically estimated size in anterior myocardial infarction. Journal of electrocardiology. 1984;17(4):361-70.

70. Bethge KP. Classification of arrhythmias. Journal of cardiovascular pharmacology. 1991;17 Suppl 6:S13-9.

71. Lown B, Wolf M. Approaches to sudden death from coronary heart disease. Circulation. 1971;44(1):130-42.

72. Herold G. Reizbildungsstörungen-ventrikuläre Extrasystolen. In: Herold G, editor. Innere Medizin. Köln: Gerd Herold; 2014. p. 277.

73. Gough PJ, Gordon S, Greaves DR. The use of human CD68 transcriptional regulatory sequences to direct high-level expression of class A scavenger receptor in macrophages in vitro and in vivo. Immunology. 2001;103(3):351-61.

74. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. Journal of cellular physiology. 2000;182(3):311-22.

75. Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzonana G, Gillessen D, Gabbiani G. A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. The Journal of cell biology. 1986;103(6 Pt 2):2787-96.

76. Radke PW, Heinl-Green A, Frass OM, Post MJ, Sato K, Geddes DM, Alton EW. Evaluation of the porcine ameroid constrictor model of myocardial ischemia for therapeutic angiogenesis studies. Endothelium : journal of endothelial cell research. 2006;13(1):25-33.

77. Rissanen TT, Nurro J, Halonen PJ, Tarkia M, Saraste A, Rannankari M, Honkonen K, Pietila M, Leppanen O, Kuivanen A, Knuuti J, Yla-Herttuala S. The bottleneck stent model for chronic myocardial ischemia and heart failure in pigs. American journal of physiology Heart and circulatory physiology. 2013;305(9):H1297-308.

78. Hoefer IE, van Royen N, Jost MM. Experimental models of arteriogenesis: differences and implications. Lab animal. 2006;35(2):36-44.

79. Weihrauch D, Tessmer J, Warltier DC, Chilian WM. Repetitive coronary artery occlusions induce release of growth factors into the myocardial interstitium. The American journal of physiology. 1998;275(3 Pt 2):H969-76.

80. Defily VD, Chilian WM. Methods for assessing coronary collateral growth: insights into mechanisms responsible for collateral development. In: Schaper W, Schaper J, editors. Collateral Circulation Heart, Brain, Kidney, Limbs. Boston: Kluwer Academic Publishers; 1993. p. 29-40.

81. Kersten JR, McGough MF, Pagel PS, Tessmer JP, Warltier DC. Temporal dependence of coronary collateral development. Cardiovascular research. 1997;34(2):306-12.

82. van Weel V, de Vries M, Voshol PJ, Verloop RE, Eilers PH, van Hinsbergh VW, van Bockel JH, Quax PH. Hypercholesterolemia reduces collateral artery growth more dominantly than hyperglycemia or insulin resistance in mice. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2006;26(6):1383-90.

83. Hattan N, Chilian WM, Park F, Rocic P. Restoration of coronary collateral growth in the Zucker obese rat: impact of VEGF and ecSOD. Basic research in cardiology. 2007;102(3):217-23.

84. Schirmer SH, Degen A, Baumhakel M, Custodis F, Schuh L, Kohlhaas M, Friedrich E, Bahlmann F, Kappl R, Maack C, Bohm M, Laufs U. Heart-rate reduction by If-channel inhibition with ivabradine restores collateral artery growth in hypercholesterolemic atherosclerosis. European heart journal. 2012;33(10):1223-31.

85. Yellon DM, Downey JM, Hearse DJ. Myocardial infarct size limitation. Principles, problems and possibilities. Giornale italiano di cardiologia. 1984;14(11):892-900.

86. Kudoh Y, Maxwell MP, Hearse DJ, Downey JM, Yellon DM. Inability of metoprolol to achieve a sustained limitation of infarct size 24 h after coronary artery embolization in the closed chest dog. Journal of cardiovascular pharmacology. 1984;6(6):1201-9.

87. Kingma JG, Jr., Denniss AR, Hearse DJ, Downey JM, Yellon DM. Limitation of infarct size for 24 hours by combined treatment with allopurinol plus verapamil during acute myocardial infarction in the dog. Circulation. 1987;75(6 Pt 2):V25-33.

88. Greve G, Saetersdal T. Problems related to infarct size measurements in the rat heart. Acta anatomica. 1991;142(4):366-73.

89. Evans RG, Val-Mejias JE, Kulevich J, Fischer VW, Mueller HS. Evaluation of a rat model for assessing interventions to salvage ischaemic myocardium: effects of ibuprofen and verapamil. Cardiovascular research. 1985;19(3):132-8.

90. Banka N, Anand IS, Nirankari OP, Gulati S, Sharma PL, Chakravarti RN, Wahi PL. Macroscopic and microscopic measurement of myocardial infarct size. A comparison. Research in experimental medicine Zeitschrift fur die gesamte experimentelle Medizin einschliesslich experimenteller Chirurgie. 1982;181(2):125-33.

91. Reimer KA, Jennings RB. The "wavefront phenomenon" of myocardial ischemic cell death. II. Transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology. 1979;40(6):633-44.

92. Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. Circulation. 1977;56(5):786-94.

93. Wright AJ, Hudlicka O. Capillary growth and changes in heart performance induced by chronic bradycardial pacing in the rabbit. Circulation research. 1981;49(2):469-78.

94. de Marchi SF, Gloekler S, Meier P, Traupe T, Steck H, Cook S, Vogel R, Seiler C. Determinants of preformed collateral vessels in the human heart without coronary artery disease. Cardiology. 2011;118(3):198-206.

95. Bullock GR, Lepran I, Parratt JR, Szekeres L, Wainwright CL. Effects of a combination of metoprolol and dazmegrel on myocardial infarct size in rats. British journal of pharmacology. 1985;86(1):235-40.

96. Zmudka K, Dubiel J, Vanhaecke J, Flameng W, De Geest H. Effects of oral pretreatment with metoprolol on left ventricular wall motion, infarct size, hemodynamics, and regional myocardial blood flow in anesthetized dogs during thrombotic coronary artery occlusion and reperfusion. Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy. 1994;8(3):479-87.

97. Lange R, Nieminen MS, Kloner RA. Failure of pindolol and metoprolol to reduce the size of non-reperfused infarcts in dogs using area at risk techniques. Cardiovascular research. 1984;18(1):37-43.

98. Kern KB, Hilwig RW, Warner A, Basnight M, Ewy GA. Failure of intravenous metoprolol to limit acute myocardial infarct size in a nonreperfused porcine model. American heart journal. 1995;129(4):650-5.

99. Kobayashi S, Tadokoro H, Ryden L, Sjoquist PO, Haendchen RV, Corday E. Local beta-adrenergic blockade does not reduce infarct size after coronary occlusion and reperfusion: a study of coronary venous retroinfusion of metoprolol. Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy. 1993;7(1):159-67.

100. Jain P, Lillis O, Cohn PF. Effects of metoprolol on early infarct expansion after acute myocardial infarction. American heart journal. 1994;127(4 Pt 1):764-73.

101. Billinger M, Raeber L, Seiler C, Windecker S, Meier B, Hess OM. Coronary collateral perfusion in patients with coronary artery disease: effect of metoprolol. European heart journal. 2004;25(7):565-70.

102. Herlitz J, Ejdeback J, Swedberg K, Waagstein F, Hjalmarson A. Goteborg Metoprolol Trial: electrocardiographically estimated infarct size. The American journal of cardiology. 1984;53(13):22d-6d.

103. Ronnevik PK, Gundersen T, Abrahamsen AM, Knutsen H, Woie L. Effect of metoprolol on early exercise-induced ST-segment changes and ventricular arrhythmias in patients with suspected acute myocardial infarction. International journal of cardiology. 1989;22(1):51-7.

104. Bernauer W. Comparative investigation of the effects of metoprolol, propranolol, practolol, and verapamil in the acute phase of experimental myocardial infarction. Klinische Wochenschrift. 1982;60(2):87-96.

105. Ablad B, Abrahamsson T, Adler G, Bjorkman JA, Bjuro T, Ek L, Ervik M, Sjoquist PO, Sutherland I, Svensson L. Cardiac anti-ischemic effect of metoprolol: role of beta-

blockade within the ischemic region. Journal of cardiovascular pharmacology. 1987;10 Suppl 2:S117-25; discussion S26-7.

106. Ryden L, Ariniego R, Arnman K, Herlitz J, Hjalmarson A, Holmberg S, Reyes C, Smedgard P, Svedberg K, Vedin A, Waagstein F, Waldenstrom A, Wilhelmsson C, Wedel H, Yamamoto M. A double-blind trial of metoprolol in acute myocardial infarction. Effects on ventricular tachyarrhythmias. The New England journal of medicine. 1983;308(11):614-8.

107. Murray DP, Murray RG, Littler WA. The effects of metoprolol given early in acute myocardial infarction on ventricular arrhythmias. European heart journal. 1986;7(3):217-22.

108. Sullivan AT, Baker DJ, Drew GM. Effect of calcium channel blocking agents on infarct size after ischaemia-reperfusion in anaesthetised pigs: relationship between cardioprotection and cardiodepression. Journal of cardiovascular pharmacology. 1991;17(5):707-17.

109. Lo HM, Kloner RA, Braunwald E. Effect of intracoronary verapamil on infarct size in the ischemic, reperfused canine heart: critical importance of the timing of treatment. The American journal of cardiology. 1985;56(10):672-7.

110. Reimer KA, Jennings RB. Effects of calcium-channel blockers on myocardial preservation during experimental acute myocardial infarction. The American journal of cardiology. 1985;55(3):107b-15b.

111. Karlsberg RP, Henry PD, Ahmed SA, Sobel BE, Roberts R. Lack of protection of ischemic myocardium by verapamil in conscious dogs. European journal of pharmacology. 1977;42(4):339-46.

112. Danish Study Group on Verapamil in Myocardial Infarction. Verapamil in acute myocardial infarction. The Danish Study Group on Verapamil in Myocardial Infarction. European heart journal. 1984;5(7):516-28.

113. Danish Study Group on Verapamil in Myocardial Infarction. Effect of verapamil on mortality and major events after acute myocardial infarction (the Danish Verapamil Infarction Trial II--DAVIT II). The American journal of cardiology. 1990;66(10):779-85.

114. Troidl C, Nef H, Voss S, Schilp A, Kostin S, Troidl K, Szardien S, Rolf A, Schmitz-Rixen T, Schaper W, Hamm CW, Elsasser A, Mollmann H. Calcium-dependent signalling is essential during collateral growth in the pig hind limb-ischemia model. Journal of molecular and cellular cardiology. 2010;49(1):142-51.

115. Nilius B, Droogmans G. Ion channels and their functional role in vascular endothelium. Physiological reviews. 2001;81(4):1415-59.

116. Kohler R, Heyken WT, Heinau P, Schubert R, Si H, Kacik M, Busch C, Grgic I, Maier T, Hoyer J. Evidence for a functional role of endothelial transient receptor potential V4 in shear stress-induced vasodilatation. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2006;26(7):1495-502.

117. Bacon KB, Westwick J, Camp RD. Potent and specific inhibition of IL-8-, IL-1 alpha- and IL-1 beta-induced in vitro human lymphocyte migration by calcium channel antagonists. Biochemical and biophysical research communications. 1989;165(1):349-54.

118. Matsumori A, Nishio R, Nose Y. Calcium channel blockers differentially modulate cytokine production by peripheral blood mononuclear cells. Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society. 2010;74(3):567-71.

119. Birx DL, Berger M, Fleisher TA. The interference of T cell activation by calcium channel blocking agents. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950). 1984;133(6):2904-9.

120. Wolfe CL, Donnelly TJ, Sievers R, Parmley WW. Myocardial protection with verapamil during ischaemia and reperfusion: dissociation between myocardial salvage and the degree of ATP depletion during ischaemia. Cardiovascular research. 1991;25(2):101-9.

121. Smith HJ, Singh BN, Norris RM, Nisbet HD, John MB, Hurley PJ. The effect of verapamil on experimental myocardial ischaemia with a particular reference to regional myocardial blood flow and metabolism. Australian and New Zealand journal of medicine. 1977;7(2):114-21.

122. Lefer AM, Polansky EW, Bianchi CP, Narayan S. Influence of verapamil on cellular integrity and electrolyte concentrations of ischemic myocardial tissue in the cat. Basic research in cardiology. 1979;74(5):555-67.

123. Johnston KM, MacLeod BA, Walker MJ. Responses to ligation of a coronary artery in conscious rats and the actions of antiarrhythmics. Canadian journal of physiology and pharmacology. 1983;61(11):1340-53.

124. Zacharowski K, Blackburn B, Thiemermann C. Ranolazine, a partial fatty acid oxidation inhibitor, reduces myocardial infarct size and cardiac troponin T release in the rat. European journal of pharmacology. 2001;418(1-2):105-10.

125. Pelliccia F, Pasceri V, Marazzi G, Rosano G, Greco C, Gaudio C. A pilot randomized study of ranolazine for reduction of myocardial damage during elective percutaneous coronary intervention. American heart journal. 2012;163(6):1019-23.

126. Dhalla AK, Wang WQ, Dow J, Shryock JC, Belardinelli L, Bhandari A, Kloner RA. Ranolazine, an antianginal agent, markedly reduces ventricular arrhythmias induced by

ischemia and ischemia-reperfusion. American journal of physiology Heart and circulatory physiology. 2009;297(5):H1923-9.

127. Kloner RA, Dow JS, Bhandari A. First direct comparison of the late sodium current blocker ranolazine to established antiarrhythmic agents in an ischemia/reperfusion model. Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics. 2011;16(2):192-6.

128. Black SC, Gralinski MR, McCormack JG, Driscoll EM, Lucchesi BR. Effect of ranolazine on infarct size in a canine model of regional myocardial ischemia/reperfusion. Journal of cardiovascular pharmacology. 1994;24(6):921-8.

129. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. Nature reviews Molecular cell biology. 2003;4(7):517-29.

130. Watanabe H, Murakami M, Ohba T, Takahashi Y, Ito H. TRP channel and cardiovascular disease. Pharmacology & therapeutics. 2008;118(3):337-51.

131. Schierling W, Troidl K, Apfelbeck H, Troidl C, Kasprzak PM, Schaper W, Schmitz-Rixen T. Cerebral arteriogenesis is enhanced by pharmacological as well as fluid-shear-stress activation of the Trpv4 calcium channel. European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery. 2011;41(5):589-96.

132. Golovina VA, Platoshyn O, Bailey CL, Wang J, Limsuwan A, Sweeney M, Rubin LJ, Yuan JX. Upregulated TRP and enhanced capacitative Ca(2+) entry in human pulmonary artery myocytes during proliferation. American journal of physiology Heart and circulatory physiology. 2001;280(2):H746-55.

133. Chi L, Ling H, Phan D. Reduction of LV Diastolic Wall Tension by Ranolazine Led to Improved Diastolic Coronary Blood Flow During Demand-Induced Acute Myocardial Ischemia in Anesthetized Canine Circulation. 2013;128: A15308.

134. Pezhouman A, Madahian S, Stepanyan H, Ghukasyan H, Qu Z, Belardinelli L, Karagueuzian HS. Selective inhibition of late sodium current suppresses ventricular tachycardia and fibrillation in intact rat hearts. Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society. 2014;11(3):492-501.

135. Gupta T, Khera S, Kolte D, Aronow WS, Iwai S. Antiarrhythmic properties of ranolazine: A review of the current evidence. International journal of cardiology. 2015;187:66-74.

136. Morrow DA, Scirica BM, Karwatowska-Prokopczuk E, Murphy SA, Budaj A, Varshavsky S, Wolff AA, Skene A, McCabe CH, Braunwald E. Effects of ranolazine on recurrent cardiovascular events in patients with non-ST-elevation acute coronary syndromes: the MERLIN-TIMI 36 randomized trial. Jama. 2007;297(16):1775-83.

137. Scirica BM, Morrow DA, Hod H, Murphy SA, Belardinelli L, Hedgepeth CM, Molhoek P, Verheugt FW, Gersh BJ, McCabe CH, Braunwald E. Effect of ranolazine, an antianginal agent with novel electrophysiological properties, on the incidence of arrhythmias in patients with non ST-segment elevation acute coronary syndrome: results from the Metabolic Efficiency With Ranolazine for Less Ischemia in Non ST-Elevation Acute Coronary Syndrome Thrombolysis in Myocardial Infarction 36 (MERLIN-TIMI 36) randomized controlled trial. Circulation. 2007;116(15):1647-52.

7. ANHANG

7.1. Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ACS	Akutes Koronarsyndrom
AP	Angina pectoris
CCR	Center for Cardiovascular Research
CD	Cluster of Differentiation
Cy	Cyanine
EKG	Elektrokardiographie
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
GS967	6-[4-(trifluoromethoxy)phenyl]-3-(trifluoromethyl)-[1,2,4]triazolo[4,3-a]pyridine
HCl	Chlorwasserstoff
HISTO	Histologie
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
ID	inner Diameter
If	funny channel
IFN	Interferon
IL	Interleukin
KCl	Kaliumchlorid
KH2PO4	Kaliumhydrogenphosphat

KHK	Koronare Herzkrankheit
LAD	left anterior descending artery
L-Typ	longlasting type
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein-1
METO	Metoprolol
Na2HPO4	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NaOH	Natriumhydroxid
NEOMED	Northeast Ohio Medical University
NSTEMI	non ST-elevation myocardial infarction/ Nicht-ST-Hebungsinfarkt
OD	outer Diameter
p.o.	per os
PBS	phosphate-gepufferte Salzlösung
PBSA	bovines Serumalbumin in phosphate-gepufferter Salzlösung
PTCA	perkutane transluminale Angioplastie
RANO	Ranolazin
ROP	repetitiv-okklusives Protokoll
SHAM	Kontrollgruppe
SMA	Smooth Muscle Actin
STEMI	ST-elevation myocardial infarction/ ST-Hebungsinfarkt
TFG	Transforming Growth Factor
TierSchG	Tierschutzgesetz
TNF	Tumornekrosefaktor
TRP	Transient Receptor Potential
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
T-Type	transient type
USA	United States of America
VERA	Verapamil
μ-CT	micro-Computertomographie

7.2. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Nadija Güc, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Evaluation antianginös wirkender Kanal- und Rezeptorblocker in einem koronaren Arteriogenesemodell der Ratte“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.
Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -*www.**icmje**.org*) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.
Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum 21.09.2015 Unterschrift

7.3. Curriculum Vitae

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

7.4. Danksagung

Zuallererst möchte ich die Chance nutzen mich bei meinem Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Ivo Buschmann herzlich zu bedanken. Er hat mir nicht nur vertrauensvoll das Dissertationsthema überlassen, sondern mir auch die Möglichkeit gegeben in einer gut strukturierten Arbeitsatmosphäre meine ersten wissenschaftlichen Schritte zu tätigen. Dafür bin ich ihm sehr dankbar.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. med. vet. Nora Gatzke, die den tierexperimentellen Teil der Arbeit mit viel Geduld und Engagement leitete.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Kollegen der AG Buschmann. Hier möchte ich mich vor allem bei Herrn Dr. med. vet. Andre Dülsner und Herrn Dr. rer. nat. Philipp Hillmeister für die Supervision und Korrektur meiner Arbeit bedanken.

Der Deutschen Herzstiftung e.V. danke ich für die finanzielle Unterstützung meines Forschungsprojektes.

Für den immer währenden Zuspruch und die von ihnen, während dieser Arbeit, häufig abverlangte Rücksicht danke ich meiner Familie, meinen Freunden und meinem Freund Matthäus.