

Aus dem Institut für Physiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchungen zum Einfluß eines Betablockers und eines ACE-Hemmers
auf die Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente nicht-infarzierter Areale des linken
und rechten Ventrikels von Ratten mit chronischer myokardialer Infarzierung

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Nicole Wunderlich

aus Aurich

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. G. Pfitzer
2. Prof. Dr. med. A. R. Pries
3. Prof. Dr. med. U. Decking

Datum der mündlichen Prüfung: 10.09.2008

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung

A. Einführung in die Thematik	1
B. Pathophysiologie nach myokardialer Infarzierung	1
1. Hämodynamische Veränderungen	
2. Metabolische Veränderungen	
3. Ventrikuläres Remodeling	
4. Sympathoadrenerges System und Renin-Angiotensin-System	
C. Morphologischer Aufbau der Herzmuskelzelle	4
D. Molekularer Mechanismus der Kontraktion der Herzmuskulatur	
– der Querbrückenzyklus	6
E. Die Rolle des Calcium in der Herzmuskelzelle	7
F. Die Calcium-Sensitivität der Myofilamente und ihre Modulation	9
G. G-Proteine und Rezeptorverhalten unter pathologischen Bedingungen	13
H. Wirkungen von Pharmaka auf das Herz	14
1. Betablocker	
2. ACE-Hemmstoffe	
I. Ziel der Arbeit	19

II. Material und Methoden

A. Liste verwendeter Chemikalien	21
B. Experimentelle Tierpräparation und Studiendesign	22
C. Experimentelles Protokoll zur Untersuchung der myofilamentären	
Ca ²⁺ -Sensitivität	24
1. Entfernung der Zellmembran mit Triton-x-100	24
2. Kraftmessung	25
3. Gelelektrophoretische Methoden	28
3.1. Isoelektrische Fokussierung (IEF)	
3.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	
3.3. Auswertung der Gelelektrophoresen	
4. Messung der Sarkomerlänge mittels Laserdiffraktion	35
C. Statistische Verfahren	36

Inhaltsverzeichnis

III. Ergebnisse

A. Einfluß der Infarktgröße auf das Verhalten des Körpergewichtes	37
B. Charakterisierung der permeabilisierten Präparate beider Ventrikel	39
C. Sarkomerlängenbestimmung	39
D. Parameter des <u>linken</u> Ventrikels	40
1. Reaktive myokardiale Hypertrophie	
2. Kraft-Calzium-Beziehung	
3. Maximal produzierte Kraft	
E. Parameter des <u>rechten</u> Ventrikels	44
F. Präparate des linken und rechten Ventrikels im Vergleich	46
G. Parameter von Tieren ohne myokardiale Infarzierung mit ACE-Hemmer- Behandlung für 3 bzw. 6 Wochen (ACE 3, ACE 6)	48
H. Ergebnisse der Gelelektrophoresen	54

IV. Diskussion

1. Einfluß des Infarktes auf das Körpergewicht und myokardiale Hypertrophie	56
2. Methodenkritische Beurteilung des Modells gehäuteter Herzmuskelfasern	60
3. Ca^{2+} -Sensitivität und HILL Koeffizient nach myokardialer Infarzierung	62
4. Beeinflussung der Ca^{2+} -Sensitivität durch Medikamentengabe	66
4.1. Betablocker	
4.2. ACE-Hemmer	
4.3. Vergleich einfacher und kombinierter Therapie	
5. Beeinflussung von F_{max} durch Medikamentengabe	73
6. Linker und rechter Ventrikel im Vergleich	74
7. Untersuchungen an Fasern nicht-infarzierter, ACE-Hemmer behandelter Herzen	75
8. Phosphorylierung der Myosin-Leichtketten (MLC)	78

V. Zusammenfassung	80
---------------------------	----

VI. Literaturverzeichnis	82
---------------------------------	----

VII. Anhang

Abkürzungsverzeichnis	92
Lebenslauf	93
Danksagung	94

I. EINLEITUNG

A. Einführung in die Thematik

Bereits im Altertum erweckten das Koronararteriensystem, der Koronarkreislauf und die Klinik der ischämischen Herzkrankheit Aufmerksamkeit. Bei Hippokrates und Galen findet man die Symptomatik der Angina pectoris beschrieben. Die pathologisch-anatomischen Befunde der Koronarsklerose wurden 1743 durch *Morgagni* dargestellt. *Fothergill* (1776) und *Jenner* (1801) stellten die Beziehungen der Angina pectoris zu den Stenosen und Verkalkungen der Koronararterien fest.

Infolge hochgradiger Einengung oder Verschlusses einer Koronararterie entsteht durch Reduktion oder Unterbrechung der myokardialen Blutversorgung eine umschriebene Herzmuskelnekrose unterschiedlicher Flächen- und Schichtausdehnung: der Myokardinfarkt.

Als Ursache kommt in den weitaus meisten Fällen ein partieller oder kompletter thrombotisch bedingter Koronarverschluß auf der Basis einer Koronaratherosklerose in Betracht. Neben der Plaqueruptur können Vasospasmen (*Tousoulis et al., 2002*), koronare Entzündungsvorgänge (*Libby et al., 2002*) oder eine Aortendissektion ebenfalls eine myokardiale Ischämie auslösen.

In Deutschland erleiden etwa 280.000 Menschen jährlich einen Herzinfarkt. Die genaue Inzidenz ist jedoch nicht bekannt, da ein Teil der Myokardinfarkte stumm, d.h. ohne die typischen Symptome geschieht und damit nicht erkannt wird (*Davis, 2001*). An einem Herzinfarkt verstarben im Jahr 2004 67.149 Personen, davon 54,8% Männer und 45,2% Frauen. Dies macht laut dem Statistischen Bundesamt etwa 7,4% aller Todesfälle in Deutschland aus.

B. Pathophysiologie nach myokardialer Infarzierung

1. Hämodynamische Veränderungen

In Abhängigkeit vom Versorgungsgebiet der verschlossenen Koronararterie, von Kollateralen und verschiedenen Kompensationsmechanismen kommt es zu unterschiedlich ausgeprägter Funktionsstörung des betroffenen Ventrikels.

Wenige Minuten nach Ischämiebeginn treten interstitielles Ödem, Leukozyteninfiltration und eine vor allem in der Diastole erkennbare Erhöhung der myokardialen „Steifigkeit“ auf. Zunächst wird die diastolische Funktion unter Anstieg des enddiastolischen Druckes gestört, danach kommt es zu einer veränderten systolischen Ventrikelfunktion mit Störung der regionalen myokardialen Kontraktilität.

Eine Reduktion von mehr als 15% des vitalen Myokards, z.B. im Rahmen eines myokardischämischen Ereignisses, ist mit einer deutlichen Herabsetzung der linksventrikulären Auswurfraction und einer Erhöhung des linksventrikulären enddiastolischen Druckes verbunden (*Parsi et al., 1977*).

Zur Kompensation des funktionell ausgefallenen, infarzierten Muskelgewebes und zur Aufrechterhaltung der linksventrikulären Funktion kommen u.a. verschiedene Mechanismen in Frage: Erhöhung der Vorlast und Senkung der Nachlast, Erhöhung der Steifigkeit und, unter dem Einfluß einer gesteigerten Sympatikusaktivität, eine Erhöhung der Kontraktilität im nicht-infarzierten Gewebe.

Schlag- und Herzminutenvolumen sind dann das Endergebnis der Wechselbeziehungen der verschiedenen Kompensationsmechanismen mit dem Ziel der Aufrechterhaltung einer adäquaten linksventrikulären Pumpfunktion.

2. Metabolische Veränderungen

Zu den hämodynamischen Veränderungen treten umfangreiche metabolische Änderungen mit einer Verschiebung der aeroben, mitochondrialen Oxidation zu einer anaerob ablaufenden Glykolyse auf. Laktat und Fettsäuren akkumulieren neben anderen Metaboliten und es kommt zu Störungen des myokardialen Stoffwechsels sowie zu einer gestörten Zellintegrität im Ischämiegebiet mit Verlust von K^+ -, Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen. Es konnte gezeigt werden, dass der intrazelluläre pH-Wert (pH_i) von Myozyten infarzierter Rattenherzen durchschnittlich 0,07 Einheiten niedriger liegt als in Myozyten sham operierter Tiere (*Kemi et al., 2006*). Die im Verlauf aus ischämischem Myokard freigesetzten Metabolite (z.B. zyklisches AMP, Adenosin, Laktat, Sauerstoffradikale, Fettsäuremetaboliten) haben zudem eine arrhythmogene Wirkung.

3. Ventrikuläres Remodeling

In Herzen mit chronischer Schädigung durch myokardiale Infarzierung findet im Laufe der folgenden Tage und Wochen eine komplexe Veränderung der ventrikulären Funktion auf zellulärer Ebene sowie der ventrikulären Architektur statt. Dieses

sogenannte „ventrikuläre Remodeling“ beinhaltet eine Reihe von Veränderungen, die sowohl die infarzierten als auch die nicht-infarzierten Areale beider Ventrikel betreffen (*Pfeffer MA et al., 1990*). Es schließt die Infarktausdehnung, die kompensatorische reaktive Hypertrophie der Herzmuskelzellen nicht-infarzierter Areale und auch die Dilatation des gesamten LV mit ein. Es ist zudem assoziiert mit der Ausbildung einer interstitiellen myokardialen Fibrose im Bereich nicht-infarzierter Areale. Die entstehende Hypertrophie der Herzmuskelfasern erfasst nicht nur Myokardgewebe des LV, sondern auch des RV, was dafür spricht, dass neben den mechanischen Einflüssen, auch zirkulierende Hormone und Wachstumsfaktoren an ihrer Ausbildung beteiligt sind (*Pfeffer MA et al., 1990*). Angiotensin II, und nach neuesten Erkenntnissen vermutlich auch Aldosteron (*Zannad et al., 2000*), spielen hierbei eine besondere Rolle, auf die im weiteren Verlauf noch näher eingegangen werden soll.

Auch das mechanische Verhalten der einzelnen Myozyten verändert sich im Rahmen des Remodelings. Es kommt zu einer verringerten Verkürzungsgeschwindigkeit (*Li et al., 1997*) und zu einer Verringerung des maximal produzierten linksventrikulären Druckes. Von einigen Autoren wird ebenso eine veränderte Ansprechbarkeit der Myofilamente auf Calcium im Sinne einer verminderten Ca^{2+} -Sensitivität (s.u.) nach myokardialer Infarzierung beschrieben (*Fellenius et al., 1985; Hajjar et al., 1990; Li et al., 1997*). Es gibt diesbezüglich aber auch sehr unterschiedliche Studienergebnisse, welche über eine unveränderte Ca^{2+} -Sensitivität (*Anand et al., 1997; Holt et al., 1998*) oder auch über eine gesteigerte Ca^{2+} -Sensitivität (*van der Velden et al., 2004*) der Myofilamente nicht-infarzierter Areale berichten.

Auch, wenn die Hypertrophie zunächst als ein Kompensationsversuch des Herzens gewertet werden kann, so ergibt sich im weiteren Verlauf meist eine deutliche hämodynamische Verschlechterung der hypertrophierten Herzen (*Pfeffer et al., 1990; Zimmer et al., 1990; Haitsma et al., 2001*). Das ventrikuläre Remodeling hat also entscheidenden Einfluß auf die Funktion beider Ventrikel und damit auf die Prognose von Patienten mit chronischer myokardialer Infarzierung. Es ist daher entscheidend, diese Funktionsstörungen zu beachten und in eine dementsprechend geeignete Therapie miteinzubeziehen.

4. Sympathoadrenerges System und Renin-Angiotensin-Aldosteronsystem

Die beiden klassischen Transmitter des Sympathikus, Adrenalin und Noradrenalin, werden in chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks sowie in postganglionären

sympathischen Nervenendigungen synthetisiert und in intrazellulären Vesikeln gespeichert. Unter physiologischen Bedingungen führt die Aktivierung des Sympathikus über seine positiv-inotrope und positiv-chronotrope Wirkung zu einer Steigerung des Herz-Zeit-Volumens. Der Sympathikus erlaubt dadurch eine Anpassung der Herzfunktion an einen erhöhten Sauerstoff- und Substratbedarf des Organismus, zum Beispiel während körperlicher Belastung. Gleichzeitig nimmt jedoch auch der myokardiale Sauerstoffverbrauch zu, wodurch bei Vorliegen von Koronargefäßstenosen Myokardischämien ausgelöst oder verstärkt werden können. Zusammenhänge zwischen der Aktivierung des sympathischen Nervensystems und myokardialen Durchblutungsstörungen sind seit langem bekannt.

Während eines akuten Myokardinfarktes beobachtet man eine generalisierte Aktivierung des sympathoadrenergen Systems. Bei Patienten mit akutem Vorderwandinfarkt konnte während der Wiedereröffnung des verschlossenen Koronargefäßes mittels Ballondilatation eine deutliche Auswaschung von Noradrenalin (NA) aus dem infarzierten Areal nachgewiesen werden (*Richardt et al., 1997*).

Erhöhte NA-Spiegel im Plasma fördern das Auftreten von Tachykardie, Vasokonstriktion und erhöhter Kontraktilität (*Francis et al., 1984; Levine et al., 1982*). Die Kontraktilität der Kardiomyozyten wird dabei durch β -Rezeptoren vermittelte Phosphorylierung von Zielproteinen wie z.B. Phospholamban (PL) oder Troponin I (TnI) gesteuert (*Garvey et al., 1988*). Damit nehmen Veränderungen in der β -adrenergen Signalkaskade, die während des Remodeling auftreten, direkten Einfluß auf die Kontraktilität des Herzens.

Die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteronsystems (RAAS) führt zudem zu einer Natrium- und Wasserretention sowie zur Vasokonstriktion und damit zu einer Erhöhung der Vor- und Nachlast im Herz-Kreislauf-System. Es kommt im Verlauf nicht selten zu einer persistierenden linksventrikulären Funktionseinschränkung.

Die konsequente Behandlung eines myokardial infarzierten Herzens muß also die Aktivitäten des neurohumoralen Systems berücksichtigen. β -Rezeptorenblocker und sogenannte ACE-Hemmer haben mittlerweile ihren festen Platz in der Therapie von Patienten mit chronischer myokardialer Ischämie gefunden.

C. Morphologischer Aufbau der Herzmuskelzelle

Während des gesamten Lebens kontrahiert und relaxiert der Herzmuskel rhythmisch unter ständiger Anpassung seiner produzierten Kraft an die verschiedenen

hämodynamischen Erfordernisse. Für den kontraktile Mechanismus ist die Konzentration des intrazellulären freien Calciums von entscheidender Bedeutung.

Um zu verstehen, wie die intrazelluläre Calcium-Konzentration in der Diastole niedrig und in der Systole hoch gehalten und der gesamte Mechanismus damit kontrolliert werden kann, erfolgt hier eine kurze Wiederholung des morphologischen Aufbaus der quergestreiften Herzmuskulatur: im Herzmuskel werden die Myofibrillen durch proteinhaltige Haltestrukturen, die sogenannten Z-Scheiben, in ca. 2µm lange Einheiten, die Sarkomere, unterteilt. Dies ist die kleinste kontraktile Einheit des Muskels, die sich durch Verschieben der Myofilamente gegeneinander verkürzen kann. Die lichtmikroskopische Querstreifung der Herzmuskulatur entsteht durch regelmäßige Anordnung der dicken und dünnen Filamente der Myofibrillen, Myosin und Aktin. Abb. 1 zeigt schematisch den Aufbau zweier Sarkomere und die so entstehende Querstreifung.

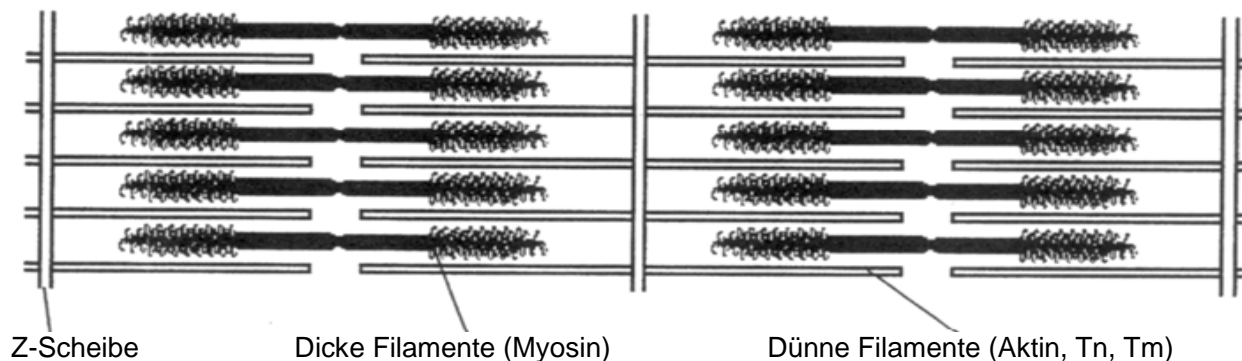


Abb. 1: Sarkomeraufbau und Querstreifung der Herzmuskulatur

Das sogenannte dicke Filament besteht hauptsächlich aus Myosin, sowie dem C-Protein und Titin, welches die Verbindung zur Z-Scheibe darstellt. Das Myosinfilament besteht aus vielen aneinander gelagerten Myosinmolekülen, deren Köpfchen nach außen ragen und für die Querbrückenbildung (s.u.) von entscheidender Bedeutung sind. Das dünne Filament besteht im Wesentlichen aus Aktin, Tropomyosin (Tm) und Troponin (Tn). Aktin stellt den Hauptbestandteil dar und besteht aus zwei spiralförmig ineinander verdrillten Ketten, dem F-Aktin, einem Polymer aus globulärem Aktin (G-Aktin). F-Aktin ist in der Zelle mit den regulatorischen Proteinen Tropomyosin und Troponin besetzt. Tropomyosin liegt dabei in der Nähe der Windungen des F-Aktin und hemmt, zusammen mit dem inhibitorischen Troponin-I (Tn-I), die Aktomyosin-ATPase solange, wie Troponin-C (Tn-C) (für die Bindung des Calciums zuständig) in nicht Ca^{2+} -gebundener Form vorliegt.

D. Molekularer Mechanismus der Kontraktion der Herzmuskulatur – der Querbrückenzyklus

Der Prozess der Kontraktion der Herzmuskelzelle entspricht dem für die Skelettmuskulatur postulierten Querbrückenzyklus. Das aus dem sogenannten Sarkoplasmatischen Retikulum (SR), einer tubulären netzwerkartigen Struktur, freigesetzte Calcium diffundiert dabei zu den Myofilamenten und lagert sich dort an die Ca^{2+} -Bindungsstelle von Tn-C an. Dadurch kommt es zu einer Konformationsänderung am Troponinmolekül und zu einer Lageänderung des Tropomyosins im Verhältnis zum Aktinfilament. Der Übergang nicht-kraftgenerierender in kraftgenerierende Querbrücken ist damit ermöglicht.

Myosin ist ein ATP-spaltendes Enzym, eine sogenannte ATPase. Durch Ankopplung des Myosinköpfchens an Aktin kommt es zu einer gesteigerten ATPase-Aktivität. Die sukzessive Abgabe von ADP und anorganischem Phosphat hat eine Verkleinerung des Winkels zwischen dem Myosinköpfchen und dem Myosinhals zur Folge. Der Vorgang der Anheftung verläuft in zwei Schritten: das der schwach gebundenen Querbrücke, bei der die Rate der Anheftungen noch im Gleichgewicht steht mit der Rate der Ablösungen, und das der stark gebundenen Querbrücke, bei der das Gleichgewicht auf seiten der Anheftung liegt. Die aktive Verkürzung bzw. der kraftgenerierende Schritt findet im Stadium der stark gebundenen Querbrücke statt.

Durch diesen Vorgang verschieben sich Aktin und Myosin gegeneinander und die Länge der Sarkomere und damit des gesamten Muskels verringert sich. Die makroskopisch sichtbare Muskelkontraktion setzt sich aus einer Vielzahl dieser elementaren Myosinkopf-Verkippungen und dem damit verbundenen „Aneinandervorbeigleiten“ der Filamente zusammen („Gleitfilamenttheorie“). Zur Ablösung des Myosins von Aktin ist die erneute Bindung von ATP notwendig.

Im Unterschied zum Skelettmuskel ist die Aktivität der ATPase des Myosins geringer. Damit kommt es pro Zeiteinheit zu weniger Myosinkopf-Verkippungen, diese bleiben jedoch länger erhalten. Es resultiert ein insgesamt niedrigerer Energieverbrauch als im Skelettmuskel. Die Abb. 2 zeigt den schematischen Aufbau der molekularen Strukturen in den Myofibrillen und ihre Phosphorylierungsmöglichkeiten.

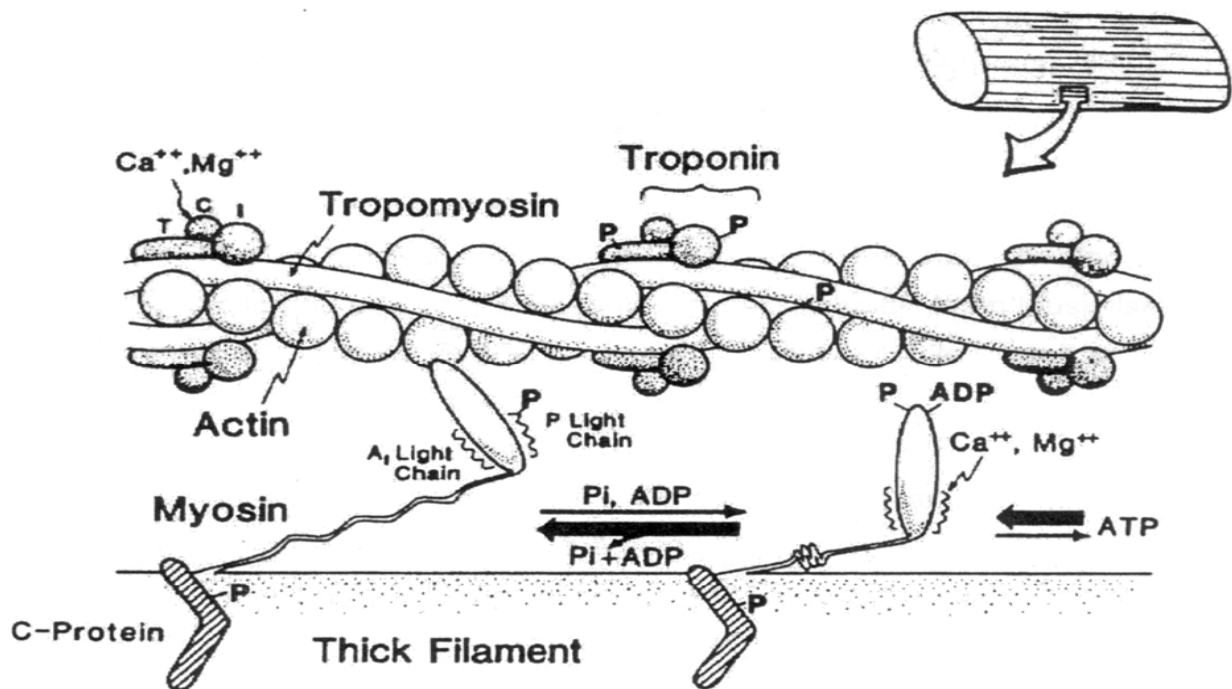


Abb. 2: Schematische Darstellung der Filamente und ihre Phosphorylierungsmöglichkeiten

E. Die Rolle von Calcium in der Herzmuskelzelle

Wie seit der Entdeckung von *Sidney Ringer* vor ca. 100 Jahren bekannt ist, spielt ionisiertes Calcium für die Herzmuskelkontraktion eine entscheidende Rolle.

Portzehl et al. konnten 1964 beweisen, dass Kontraktion und Relaxation von intakten, wie auch semi-intakten (z.B. gehäuteten) myokardialen Muskelfasern von der intrazellulären Konzentration des freien Calciums abhängig sind, und das freie intrazelluläre Calcium somit eine wichtige Rolle bei der Regulation der kardialen Kontraktilität spielt.

Die Zellmembran trennt hierbei den Extrazellularraum, mit einer Konzentration an freiem Calcium von etwa 1mM, von dem Intrazellularraum. Während das freie Calcium in der Herzmuskelzelle eines relaxierten Herzens nur etwa 0.1-0.2µM beträgt, liegt die gesamte Menge an intrazellulärem Calcium um ein Vielfaches höher. Ein Großteil hiervon ist im SR gebunden und wird erst durch von außen einströmendes Calcium freigesetzt (*Marban et al., 1980*).

Es besteht also ein starker Konzentrationsgradient in Richtung des Zytosols. Ob Ca^{2+} -Ionen in die Zelle gelangen oder nicht, hängt von dem Funktionszustand der in die Zellmembran eingelassenen Calcium-Kanäle ab. Im Ruhezustand sind die meisten

dieser Kanäle verschlossen, so dass eine Diffusion von Ca^{2+} -Ionen praktisch nicht möglich ist. Dennoch in das Zellinnere gelangende Ionen werden mittels einer ATP-gesteuerten Ca^{2+} -Pumpe der Zellmembran oder durch $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher in den Extrazellulärraum befördert (Caroni et al., 1980).

Während des Aktionspotentials kommt es zu einer Depolarisation der Zellmembran und Ca^{2+} strömt über spannungsgesteuerte L-Typ Calcium-Kanäle der Zellmembran in das Innere ein und triggert dort die weitere Freisetzung von Ca^{2+} aus dem SR.

Die Konzentration des freien Calciums in der Zelle ist streng reguliert. Neben den oben erwähnten Mechanismen von Calcium-Pumpen und -Austauschern der äußeren Zellmembran, werden durch das Ansteigen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration Calcium-Pumpen, sogenannte Ca^{2+} -ATPasen (Jorgensen et al., 1982), in der Membran des SR aktiviert und Calcium vermehrt in dieses zurückgepumpt.

Die Aktivität dieser Ca^{2+} -ATPasen des SR wird durch ein Phosphoprotein, das Phospholamban (PL), reguliert. PL hemmt im dephosphorylierten Zustand die Ca^{2+} -ATPase. Diese Hemmwirkung wird durch Phosphorylierung aufgehoben. PL kann an drei verschiedenen Stellen des Moleküls über eine cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA), über eine Ca^{2+} -Calmodulin-abhängige Proteinkinase (CaM-Kinase II) oder in geringerem Maße auch über die Proteinkinase C phosphoryliert werden (Luo et al., 1994). Funktionell am bedeutendsten ist die Phosphorylierung durch die PKA.

Die CaM-Kinase II wird durch einen Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration aktiviert, auf diese Weise fördert Calcium seinen eigenen Rücktransport in das SR.

Während einer β -adrenergen Stimulation kommt es zu einem Anstieg von cAMP in der Zelle (s.u.) und damit zu einer Aktivierung der PKA. Die so getriggerte Phosphorylierung von PL hat ebenfalls eine gesteigerte Ca^{2+} -Aufnahme in das SR zur Folge. Auf diese Weise kann der Herzmuskel schneller relaxieren – eine wichtige Bedingung für die gesteigerte Frequenz bei Sympathikusaktivierung. Gleichzeitig kann durch die gesteigerte Aufnahme von Ca^{2+} ins SR bei der nächsten Systole mehr Ca^{2+} aus diesem freigesetzt werden, d.h. der Herzmuskel kann mehr Kraft entfalten, i.S. der positiv-inotropen Wirkung bei Sympathikusaktivierung.

Die wichtige Rolle, die PL bei der Steuerung der Kontraktilität spielt, wurde durch Untersuchungen an PL-Knockout-Mäusen (Kranias et al., 1998) demonstriert. Dies sind Mäuse, bei denen mittels einer gentechnischen Manipulation gezielt ein oder mehrere Gene deaktiviert wurden. Im Fall des PL weisen die Knockout-Mäuse eine deutlich höhere Ca^{2+} -Aufnahme in das SR auf als Mäuse mit normaler Konzentration und

Funktion an PL, da die Ca^{2+} -ATPase des SR nicht durch unphosphoryliertes PL gehemmt wird. Eine β -adrenerge Stimulation hat in diesem Fall keinen weiteren Einfluß auf die Ca^{2+} -Aufnahme in das SR.

Auch die Aktivität der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase stellt sich im Rahmen von Kompensationsmechanismen nach myokardialer Infarzierung verändert dar. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der Ca^{2+} -ATPase und damit die Calciumaufnahme in das SR in nicht-infarzierten Arealen des LV von Herzen mit chronischer myokardialer Infarzierung deutlich herabgesetzt war (*Afzal und Dhalla et al., 1996*). Dies erklärt möglicherweise die gestörte myofilamentäre Relaxation von chronisch geschädigten Herzen (*Carafoli et al., 1988; Dhalla et al., 1992*). Der veränderte Ca^{2+} -Transport des SR ist zum Teil Folge einer veränderten Gen-Expression der Ca^{2+} -ATPase (*Afzal et al., 1996; Mac Lennon et al., 1997*). Auch die an der Calciumhomöostase beteiligten sarcolemmalen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher zeigen in Herzen mit chronischer myokardialer Infarzierung, trotz erhöhter Expression, eine verminderte Aktivität (*Quinn et al., 2003*). Erhöhte Katecholamin- und Renin-Angiotensin-Spiegel tragen neben anderen Mechanismen in myokardial infarzierten Herzen zu einem vermehrten Auftreten von Defekten an diesen molekularen Strukturen und Mechanismen des SR- Ca^{2+} -Transportsystems bei (*Packer, 1997*).

F. Die Calcium-Sensitivität der Myofilamente und ihre Modulation

Wie oben erwähnt, führt eine Erhöhung des freien intrazellulären Calciums über die Regulation des Troponin-Tropomyosin-Systems zur vermehrten Ausbildung von Querbrücken und damit zu einer vermehrten Kraftproduktion (*Rüegg et al., 1992*).

In den vergangenen Jahren wurden weitere Mechanismen, wie z.B. die veränderte Ansprechbarkeit der Myofibrillen auf Calcium, d.h. die Ca^{2+} -Sensitivität, entdeckt. Als Maß für die Ca^{2+} -Sensitivität wurde der EC_{50} Wert genommen. Dieser steht für die Konzentration des freien Calciums in der Zelle, welche nötig ist, um eine 50%ige Aktivierung der Myofilamente, gemessen an der maximal induzierbaren Aktivität durch eine maximale Ca^{2+} -Konzentration, herbeizuführen. Eine höhere Ca^{2+} -Sensitivität bedeutet eine niedrigere Ca^{2+} -Konzentration (oder ein höherer pCa-Wert (= negativer dekadischer Logarithmus) der Ca^{2+} -Konzentration), die nötig ist für eine halb-maximale

Aktivierung der Filamente. Im Umkehrschluß steht ein verminderter, zur halb-maximalen Aktivierung benötigter pCa für eine verminderte Ca^{2+} -Sensitivität.

Der Hill Koeffizient, n_H , beschreibt die Kurvensteigung exakt am Punkt des EC_{50} -Wertes. Er stellt ein Maß der Kooperativität dar (*Shiner et al., 1984; Morano et al., 1991*).

Es wurde deutlich, dass der für die Kontraktilität entscheidende Parameter nicht die absolute Konzentration von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ allein ist, sondern dass die Kontraktilität auch mittels veränderter Ca^{2+} -Sensitivität der regulatorischen Proteine alteriert werden kann. Die Beziehung zwischen produzierter Kraft und zytosolischer Ca^{2+} -Konzentration kann also sehr variabel sein.

Es hat sich gezeigt, dass u.a. die Sarkomerlänge (*Kentish et al., 1986*), die Zusammensetzung der Troponin-Isoformen (*Akella et al., 1997*), die Phosphorylierung von Proteinen des Sarkomers (*Herzig et al., 1982; Morano et al., 1986 und 1988*) sowie auch der intrazelluläre pH-Wert oder die Phosphatkonzentration (*Kemi et al., 2006*) entscheidenden Einfluß auf diese Ca^{2+} -Sensitivität nehmen.

Durch die genannten Mechanismen wird die Aktivität des Myokards über eine große Bandbreite hinweg an hämodynamische Erfordernisse angepaßt. Eine bisher noch nicht vollständig gelöste Frage ist das Ausmaß und der genaue Mechanismus der Regulation der Ca^{2+} -Sensitivität.

1. Kurzfristige Regulationsmechanismen der Calcium-Sensitivität

Zu den kurzfristigen Mechanismen der Ca^{2+} -Sensitivität rechnet man z.B. Veränderungen der Sarkomerlänge (SL). Wie 1918 von Starling (*Starling et al., 1918*) erstmals beschrieben und später von Lakatta (*Lakatta, 1992*) aufgegriffen, beschreibt der Frank-Starling Mechanismus die Tatsache, dass die Auswurfleistung des Herzens abhängig ist vom enddiastolischen Ventrikelvolumen, wobei die Kontraktionskraft zunächst proportional der Herzmuskelfaserlänge zunimmt, um nach Überschreiten einer kritischen Länge (Überdehnung) wieder abzufallen. Der Frank-Starling Mechanismus stellt damit einen wesentlichen physiologischen Mechanismus zur Aufrechterhaltung der Strömungskontinuität im Lungen- und Körperkreislauf dar und beschreibt, wie die sich ständig verändernden hämodynamischen Erfordernisse während körperlicher Arbeit und auch während chronischer Schädigung des Herzens erfüllt werden können. Die zelluläre Basis dieses Mechanismus ist die Abhängigkeit der produzierten Kraft von der

Sarkomerlänge (SL). So kann z.B. eine erhöhte SL eine Zunahme der Ca^{2+} -Sensitivität bewirken (*Kentish et al., 1986; Lakatta, 1992*). Zwei mögliche Ansatzpunkte zur Erklärung dieses Phänomens werden diskutiert: 1. Die mit Zunahme der SL vermehrte, Ca^{2+} -getriggerte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR und 2. Eine durch die erhöhte SL veränderte Ca^{2+} -Sensitivität des Troponin C gegenüber Calcium.

Die kurzfristige Regulation der Ca^{2+} -Sensitivität ist weiterhin vom ionalen Milieu des Zytosols, von seinem pH Wert oder auch von seiner Phosphatkonzentration abhängig. Ein Abfall des intrazellulären pH-Wertes ist assoziiert mit einer verringerten Kontraktilität der Kardiomyozyten (*Kemi et al., 2006*). Eine erhöhte Konzentration an anorganischem Phosphat im Zytosol führt ebenfalls zu einer Rechts-Verschiebung der Kraft- Ca^{2+} -Kurve und damit zu einer Abnahme der Ca^{2+} -Sensitivität (*Kentish et al., 1986*).

2. Mittelfristige Regulationsmechanismen der Calcium-Sensitivität

Einfluß auf die mittelfristige Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente haben die sogenannten „second messenger“ (zweite Botenstoffe). Dies sind Substanzen, deren Konzentrationsanstieg innerhalb der Zielzellen als Folge des primären Botenstoffs auftritt. Hormone können in den allermeisten Fällen nicht ohne weiteres die Zellmembran durchdringen. Die Aufgabe der second messenger ist deshalb der Transfer des hormonalen Signals durch die Membran hindurch und die Übersetzung des Signals in Änderungen des Stoffwechsels der Zelle. Dies geschieht unter Mitwirkung der G-Proteine, auf die im Folgenden noch näher eingegangen werden soll.

Der am besten bekannte second messenger ist das 3', 5'-cyclo AMP, kurz als cAMP bezeichnet. Es entsteht, z.B. als Vermittler der Adrenalin-Wirkung, durch Einfluß der Adenylatzyklase, die, nach Ankopplung des Substrates an den Rezeptor, durch die α -Untereinheit eines G-Proteins aktiviert wird. Es wird in der Zelle rasch durch die Phosphodiesterase zu AMP abgebaut; die Wirkung des cAMP als second messenger ist daher nur kurz. Das cAMP aktiviert die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA).

Die Phosphorylierung von Tn-I, die durch die aktivierte PKA katalysiert wird, beschleunigt die Ablöserate von Ca^{2+} vom Tn-C und führt damit zu einem Abfall in der Ca^{2+} -Sensitivität (*Herzig et al., 1981*). Die Phosphorylierung von Tn-I scheint zusammen mit der Phosphorylierung von PL durch die PKA einer der Mechanismen der veränderten Kontraktilität, insbesondere der beschleunigten Relaxation unter β -adrenerger Stimulation des Herzens zu sein (*Kögler, 1997*). Auch das Myosin-bindende Protein C

und Titin können durch die PKA phosphoryliert werden und somit zu einer veränderten Ca^{2+} -Sensitivität beitragen (McClellan et al., 2001; Granzier et al., 2004).

Eine Phosphorylierung der regulatorischen leichten Ketten (p-MLC) bewirkt einen vermehrten Übergang der schwach gebundenen in die stark gebundene Querbrücke (Sweeney et al., 1990) und damit eine größere Kraftentfaltung bei submaximalem Calcium, d.h. eine Zunahme der Ca^{2+} -Sensitivität (Morano et al., 1985). Die Aktivität der Myosin-Leichtketten Kinase (MLCK) und damit die Phosphorylierung der leichten Ketten ist abhängig vom myoplasmatischen Ca^{2+} -Spiegel. Ca^{2+} stellt damit selbst einen Botenstoff dar. Es hat somit im Skelett- wie auch im Herzmuskel einen zweifachen Effekt auf die Myofilamente: Auf Ebene der dünnen Filamente reguliert es die Aktivierung durch einen Anstieg des Ca^{2+} -gebundenen Tn-C, auf Ebene der dicken Filamente reguliert es die Phosphorylierung der MLCK.

Auch IP_3 und DAG als Vermittler der Ang-II Wirkung stellen wichtige second messenger dar, auf die im Folgenden noch näher eingegangen werden soll.

3. Langfristige Regulationsmechanismen der Ca^{2+} -Sensitivität

Die Proteine des Troponin-Komplexes (Tn-I, Tn-C, Tn-T) werden als Isoformen exprimiert und haben Einfluß auf die Ca^{2+} -Sensitivität. Beispielsweise wird im embryonalen Myokard das Tn-I des langsamen skeletalen Muskels (ssTn-I) vermehrt exprimiert, was mit einer hohen Ca^{2+} -Sensitivität und einer geringen pH-Abhängigkeit der Kontraktion einhergeht (Nassar et al., 1991). In der postnatalen Entwicklung kommt es dann zu einer Abnahme der Ca^{2+} -Sensitivität, deren Ursache eine physiologische Änderung der Proteinexpression der Isoformen des Troponin ist (Siedner et al., 2003). Längerfristige Veränderungen der Ca^{2+} -Sensitivität unter pathologischen Bedingungen werden v.a. in einer veränderten Zusammensetzung der Troponin-Isoformen gesehen. Wie Li 1997 darstellen konnte, wiesen gehäutete Herzmuskelfasern sieben Tage nach transmuraler myokardialer Infarzierung zwar einen signifikant verminderten Gehalt an Tn-I, dafür aber einen prozentual erhöhten Anteil an phosphoryliertem Tn-I und Tn-T auf. Der Gehalt an den Myosin-Isoformen und an Tn-T war dabei nicht signifikant verändert. Es resultierte eine um 10-15% geminderte Kraftentfaltung bei submaximalen Ca^{2+} -Konzentrationen bei unveränderter maximal produzierter Kraft.

Es ist in den letzten Jahren klar geworden, dass die Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente unter post-ischämischen Bedingungen oft verändert und von einigen Autoren als herabgesetzt beschrieben worden ist. Die Gabe von Medikamenten, die ein Ansteigen

dieser Ansprechbarkeit der Myofilamente auf Calcium hervorrufen könnten (im Gegensatz zu denen, die die intrazelluläre Konzentration des freien Ca^{2+} steigern), stellt sicherlich ein interessantes Konzept in der Behandlung der Herzerkrankung nach Myokardinfarkt dar.

G. G-Proteine und Rezeptorverhalten unter pathologischen Bedingungen

G-Proteine sind eine Familie membrangebundener Proteine, die chemische Signale verschiedener Rezeptoren der Zelloberfläche in das Innere der Zellen übermitteln.

Das G-Protein ist ein Heterotrimer mit den Untereinheiten α , β und γ . Die α -Untereinheit besitzt die Fähigkeit, entweder GDP oder GTP zu binden. Mit GTP befindet es sich im aktiven Zustand. Die aktive α -Untereinheit des G-Proteins dissoziiert von den beiden anderen Untereinheiten ab und lagert sich in der flüssigen Membran mit bestimmten Enzymen zusammen. Im Falle des G_s ist dies die Adenylatzyklase, welche hierdurch ihrerseits aktiviert wird und die Umwandlung von ATP zu dem second messenger cAMP katalysiert. Die Hydrolyse von GTP zu GDP an der α -Untereinheit des G-Proteins läßt die Adenylatzyklase wieder inaktiv werden und führt so zur Rückkehr in den Ausgangszustand (*Schmidt et al., 2000*). Viele Signalproteine sind unter pathologischen Bedingungen ebenfalls von Veränderungen betroffen (*Ungerer et al., 1993*).

Es konnte außerdem beobachtet werden, dass in chronisch infarzierten Herzen eine verringerte Dichte bestimmter Rezeptoren vorliegt. Dies wurde im Besonderen gezeigt für die β_1 -Adrenozeptoren im Infarktgebiet bzw. in dessen Randgebiet, mit der Folge einer geringeren Adenylatzyklase-Aktivität (*Bristow et al., 1993; Warner et al., 1992*) und erhöhten Spiegeln an inhibitorischem G-Protein (G_i) (*Feldmann et al., 1988*).

Veränderungen der β_1 -Adrenozeptorendichte gehen mit einer Desensitivierung gegenüber β -agonistischer Stimulation, wie sie nach myokardialer Infarzierung gehäuft auftritt, einher. Neben einer veränderten Rezeptordichte spielen auch alterierte Signaltransduktionswege bei der beobachteten Desensitivierung eine Rolle (*Kompa et al., 1999*).

H. Wirkungen von Pharmaka auf das Herz

Die unterschiedlichen Ansätze in der Therapie eines chronisch geschädigten Herzens nach akuter myokardialer Infarzierung haben eine relativ kurze Geschichte: seit 1912 die Koronarthrombose als Ursache des akuten Myokardinfarktes gefunden wurde, ging die Entwicklung der Therapie zunächst nur sehr langsam voran. Neben der Einführung der oralen Antikoagulation standen die Digitalisierung und eine entsprechend lange Bettruhe als therapeutische Maßnahmen zur Verfügung.

Mit der *GISSI-Studie* begann 1986 der routinemäßige Einsatz der intravenösen Thrombolyse in der Frühphase des akuten Myokardinfarktes. ACE-Hemmer werden seit 1994/95 routinemäßig zur Verbesserung der linksventrikulären Funktion und der Langzeitprognose nach dem akuten Myokardinfarkt eingesetzt.

Erste klinische Prüfungen, die bei einem Vergleich zwischen Betablockern und Placebo einen Trend zugunsten der Betablocker in der Postinfarktperiode erkennen ließen, wurden bereits 1965 durchgeführt. Erst 20 Jahre später ließ sich die lebensverlängernde Wirkung der Betablocker auch statistisch verifizieren (ISIS I - First International Study of Infarct Survival, 1986).

1. Blockade β -adrenerger Rezeptoren

Betablocker bilden die Klasse-II-Antiarrhythmika und sind kompetitiv wirkende Hemmstoffe der Katecholaminwirkung in allen Geweben, die mit β -Rezeptoren ausgestattet sind. Die Zahl der Rezeptoren variiert von Organ zu Organ und mit bestimmten Krankheiten sowie der Dauer der Therapie mit β -blockierenden Substanzen („up“-Regulation bei längerer Blockade ohne Intrinsische Aktivität).

Einige Betablocker sind, trotz ihrer blockierenden Wirkung, selbst mehr oder minder starke Agonisten der β -Rezeptoren (partielle agonistische Aktivität = Intrinsische Aktivität (ISA)). Der hier verwendete Betablocker *Metoprolol* wirkt selektiv auf den β_1 -Rezeptor und besitzt kaum intrinsische Aktivität.

Treten β -Agonisten an den Rezeptor heran, so kommt es zu einer rezeptorvermittelten Stimulation der Adenylatzyklase unter Einschaltung von G-Proteinen (s.o.). Die Bildung von cAMP wird dadurch gesteigert und es kommt zu einer Aktivierung der cAMP-abhängigen PKA. Die Phosphorylierung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle und damit eine Zunahme des langsamen Ca^{2+} -Einwärtsstroms in das Zytosol in der Depolarisa-

tionsphase des Aktionspotentials sind die Folge. cAMP beschleunigt aber auch über die Aktivitätserhöhung der PKA eine vermehrte Phosphorylierung von Tn-I und PL und damit die Erschlaffung der kontraktile Elemente.

Ein Ansteigen des zytosolisch freien Calciums führt zu einer Aktivierung der CaM-Kinase-II und bewirkt damit ebenfalls die Phosphorylierung von PL. Die Aktivierung der Ca^{2+} -ATPase des SR mit vermehrter Aufnahme von Calcium in das SR sind die Folge.

β -Rezeptoren blockierende Substanzen unterbinden das Andocken der Agonisten an den Rezeptor und verhindern damit, je nach eigener intrinsischer Aktivität, die Aktivierung der Adenylatzyklase als ersten Schritt in der Kaskade der cAMP-vermittelten Ca^{2+} -Freisetzung. Die Abb. 3 zeigt den molekularen Angriffspunkt der Betablocker an der Myokardzelle.

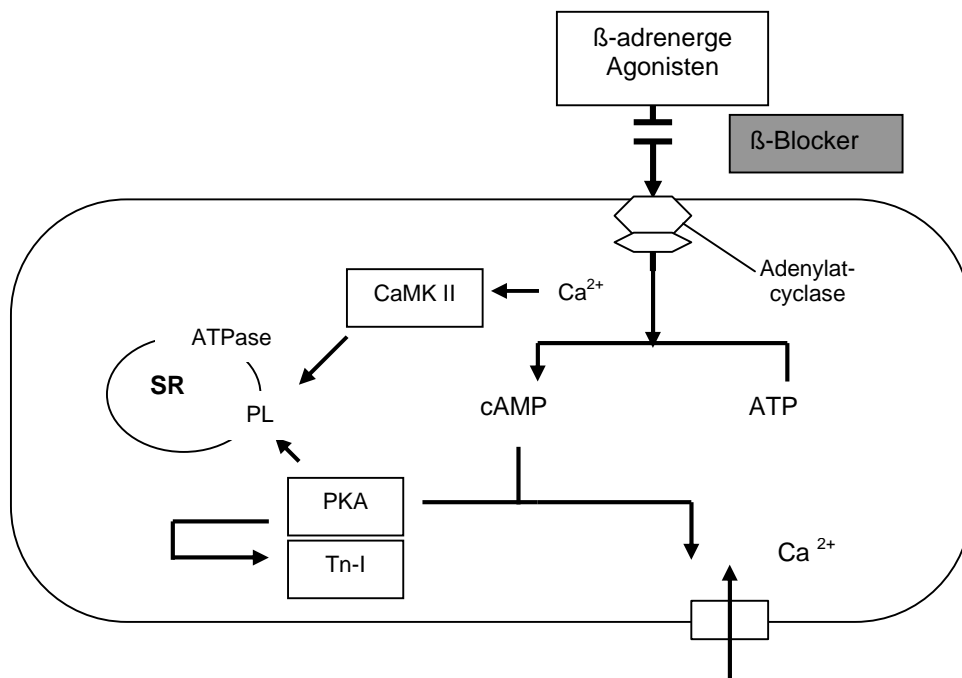


Abb. 3: Schematische Übersicht über den Angriffspunkt von Betablockern an der Myokardzelle. Durch β -adrenerge Agonisten kommt es zur vermehrten cAMP-Bildung und über eine Aktivitätserhöhung der PKA zur Phosphorylierung und Aktivierung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle mit Zunahme des Ca^{2+} -Einstroms von außen und getriggertem Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR, sowie zur Phosphorylierung von Tn-I und damit zur schnelleren Relaxation der Myofilamente. Weiterhin kommt es zur Phosphorylierung des PL mit Aktivitätserhöhung der Ca^{2+} -ATPase des SR und einem beschleunigten Zurückpumpen von Ca^{2+} in das SR. Die Gabe β -blockierender Agentien verhindert diese Reaktionskaskade. PL wird außerdem durch die CaMK II phosphoryliert.

Während eines akuten Myokardinfarktes beobachtet man eine generalisierte Aktivierung des sympathoadrenergen Systems. Die Plasmakatecholamine steigen

binnen einer Stunde nach Infarkt ereignis im Durchschnitt auf das Zwei- bis Dreifache an (Bernauer, 1983). Dennoch sind verminderte Konzentrationen an cAMP und PKA in Herzen mit chronischer myokardialer Infarzierung im Vergleich zu sham operierten Herzen gemessen worden. Es wird vermutet, dass die verminderte β -adrenerge Ansprechbarkeit auf Noradrenalin auf einer veränderten Signaltransduktion oder einer möglichen down-Regulation der β -adrenergen Rezeptoren beruht (van der Velden et al., 2004).

Der praktische Wirkungsnachweis unverzüglicher Betablocker-Therapie nach akutem Infarkt, wie die Reduktion von Mortalität und Re-Ischämiehäufigkeit, gelang bereits vor 16 Jahren (Beta-Blocker Heart Attack Trial Research Group, 1982; ISIS I First International Study of Infarct Survival; Collab. Group 1986).

Der eigentlich zugrundeliegende Mechanismus, der unter β -Blockade die Überlebenschancen nach myokardialer Infarzierung verbessern soll, ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt worden. Ursächlich ist eine verbesserte Energiebereitstellung im Myokard postuliert worden (Eichhorn et al., 1994), sowie eine Minderung der toxischen Wirkungen (Cruickshank et al., 1987), also der arrhythmogenen und ischämischen Effekte hoher Katecholaminspiegel auf das Myokard. Es konnte gezeigt werden, dass ebenfalls eine verminderte Expression inflammatorischer Zytokine unter β -adrenerger Blockade als ursächlich für die verbesserte kardiale Gesamtsituation von Patienten mit myokardialer Infarzierung anzusehen ist (Cheng et al., 2005). Auch eine verminderte Apoptoserate von Kardiomyozyten aus infarzierten wie auch nicht-infarzierten Arealen nach akutem Myokardinfarkt wird diskutiert (Yang et al., 2005).

2. Hemmstoffe des Angiotensin-Konversions-Enzyms (ACE)

Hemmstoffe des Angiotensin-Konversions-Enzyms (ACE-Hemmer) üben einen kardioprotektiven Effekt auf Herzen mit chronischer myokardialer Infarzierung aus.

Ein entscheidender Faktor wird in der Hemmung des aktivierten Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) gesehen (Packer et al., 1997). Angiotensin II (Ang II) wirkt als trophischer Faktor und direkter Modulator der Kontraktion und des „Ca²⁺-Handlings“, sowie als lokaler Vasokonstriktor (Campbell et al., 1987). Bei pharmakologischer Anwendung am Menschen ist Ang II etwa 40 Mal stärker blutdrucksteigernd als NA.

Abb 4 zeigt den stark vereinfacht dargestellten pathophysiologischen Zusammenhang: Ausgangssubstrat der Kaskade ist das Angiotensinogen, das durch das Enzym Renin in

Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP₃) und dem 1,2-Diacylglycerol (DAG). IP₃ mobilisiert Ca²⁺ aus dem SR. DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC) und katalysiert damit die Phosphorylierung verschiedener zellulärer Proteine, einschließlich der myofilamentären Proteine (Solaro *et al.*, 1998). Inwieweit die PKC Einfluss auf die myokardiale Ca²⁺-Sensitivität nimmt, ist bis heute Gegenstand der Diskussion (Solaro *et al.*, 2002). Auch der Na⁺/H⁺-Antiporter und der Na⁺/Ca²⁺-Austauscher werden durch PKC-abhängige Mechanismen beeinflusst. Die durch Ang II aktivierten second messenger führen also zu einer veränderten Kontraktilität, einerseits durch die Alteration intrazellulärer Ca²⁺-Spiegel und andererseits durch die Beeinflussung der Ca²⁺-Sensitivität selbst. Ein Großteil der Angiotensin II vermittelten Effekte erfolgt durch Aktivierung des AT₁-Rezeptors. Dies betrifft vor allem die Vasomotorik, Aldosteronsekretion, Hypertrophie und Wachstum von Zellen sowie die Freisetzung von O₂- und NO.

Die kardioprotektive Wirkung der ACE-Hemmer scheint darin zu liegen, dass sie in die komplexen Kompensations- und Umstrukturierungsmechanismen nach Infarkt, also in das Remodeling, eingreifen. Es wird angenommen, dass eine myokardiale Hypertrophie infarzierter Herzen, zumindest in Teilen, auf einer Ang-II-induzierten Stimulation der Phospholipase C und damit einer Aktivitätserhöhung der PKC beruht (Van Kats *et al.*, 2000). Es konnte gezeigt werden, dass 8 Wochen nach chronischer myokardialer Infarktzierung bei Ratten eine erhöhte Aktivität der PKC vorlag (Wang *et al.*, 2003).

ACE-Hemmer verringern die Menge des zirkulierenden wie auch des gewebsständigen Ang II. Damit kommt es zu einer signifikanten Reduktion der Myokardhypertrophie und einer verringerten, kompensatorischen Neusynthese von Kollagen (Brilla *et al.*, 1994; Van Kats *et al.*, 2000).

Auch der verminderte Abbau des Bradykinin spielt hierbei eine entscheidende Rolle (Martorana *et al.*, 1990; Linz *et al.*, 1998). Bradykinin wird durch das ACE oder andere Carboxypeptidasen, z.B. die Kininase I, zu inaktiven Fragmenten abgebaut. Im Gegensatz zu Ang II wirkt Bradykinin vasodilatatorisch und damit blutdrucksenkend. Durch die Hemmung des ACE wird somit auch der Abbau des Bradykinin gehemmt. Mit ansteigender Konzentration des Bradykinin kommt es zu einer vermehrten Freisetzung von Stickoxid (NO = EDRF), Prostaglandin E₂ und Prostazyklin I₂, welche eine Vasodilatation vermitteln. Zudem nehmen die Prostaglandine ebenfalls Einfluss auf die Mitogenese und auf die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (Wiemer *et al.*, 1992).

Neben den o.g. Wirkungen stimuliert das Ang II auch die Synthese und Freisetzung von Aldosteron aus der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde unter Zunahme des extra-

zellulären Volumens durch die vermehrte Rückresorption von Na^+ im proximalen Tubulus. Vasokonstriktion und Natrium-/Wasser-Retention führen schließlich über eine Erhöhung des peripheren Widerstandes zur ventrikulären Dilatation und zur weiteren Verminderung der Kontraktilität. ACE-Hemmer verbessern erwiesenermaßen sowohl bei Patienten mit schwerem Herzversagen als auch bei Patienten mit asymptomatischer ventrikulärer Dysfunktion nach myokardialer Infarzierung das Überleben und die Pumpfunktion des Herzens (*The CONSENSUS TRIAL Study Group, 1987; Pfeffer MA, 1992*).

Das in dieser Studie verwendete Ramipril ist eine Vorstufe des aktiven Metaboliten *Ramiprilat*. Ramiprilat als aktiver Metabolit ist in vitro einer der stärksten Hemmstoffe des ACE aus menschlichem Plasma.

I. Ziel der Arbeit

Die funktionellen, biochemischen und morphologischen Veränderungen, die nach myokardialer Infarzierung entstehen und auf die man mit verschiedenen therapeutischen Ansätzen Einfluß zu nehmen versucht, sind intensiv untersucht worden. Dennoch ist über die zellulären und molekularen Mechanismen in diesem Prozeß der Adaptation des verbleibenden Herzmuskelgewebes nach Infarkt insgesamt noch wenig bekannt.

Vor allem das Verhalten der Myofilamente in bezug auf ihre Ca^{2+} -Sensitivität und der Einfluß verschiedener Medikamente auf diese möglichen Veränderungen in Herzen mit chronischer Infarzierung sind bisher nicht abschliessend untersucht worden.

Es wurde bereits auf die Bedeutung und den Einfluß bestimmter Kompensationsmechanismen bezüglich der Kontraktilität nach Infarkt hingewiesen. Durch veränderte Stimulierung der Rezeptoren auf der Zelloberfläche sowie veränderte Signaltransduktionswege wird einerseits die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration, welche ein Signal für die Aktivierung der kontraktile Elemente darstellt, verändert, andererseits aber auch die Ansprechbarkeit der Myofibrillen auf das Calcium selbst beeinflusst. Für die Regulierung der Ca^{2+} -Sensitivität werden verschiedene Zielproteine und Signalkaskaden diskutiert, die möglicherweise für die Verschiebung der Kraft-Calcium-Beziehung zuständig sind. Dazu gehören die regulatorischen Proteine der Herzmuskelzelle Tropomyosin und Troponin, sowie die MLCK, die die Phosphorylierung der leichten Ketten des Myosins reguliert. Eine veränderte Ca^{2+} -Homöostase und Ca^{2+} -

Sensitivität sind sicherlich als entscheidende Funktionsparameter nach chronischer myokardialer Infarzierung zu sehen.

Diese Arbeit soll untersuchen, ob in Herzen mit chronischer Infarzierung ein verändertes mechanisches Verhalten der Myofilamente vorliegt und ob die Ca^{2+} -Sensitivität des überlebenden Myokards sechs Wochen nach Infarkt verändert ist. Ob und in welchem Ausmaß herzwirksame Medikamente Einfluß darauf nehmen, sollte hier weiterhin zu untersucht werden.

Um den kontraktilen Mechanismus unabhängig von Membranprozessen untersuchen zu können, wurden die Präparate mit Triton-x-100 gehäutet. Bei diesem chemischen Häutungsverfahren werden die Fettsäuren der Zellmembran und anderer membranhaltiger Strukturen wie der Mitochondrien und des SR aufgelöst. Prozesse, die über diese Strukturen reguliert werden, können nicht ablaufen. So ist es möglich, durch definierte extrazelluläre Ca^{2+} -Gaben, die Konzentration an freiem intrazellulären Calcium zu bestimmen und somit die intrazellulären Vorgänge beeinflussen zu können. Man kann auf diese Weise die kontraktilen Proteine bei konstanten Ca^{2+} -Konzentrationen funktionell untersuchen.

Stellvertretend für die Herzmuskulatur wurden Trabekel des Herzmuskels aus dem nicht-infarzierten Bezirk der links- und rechtsventrikulären Herzwand gewählt. Das Septum wurde aus den Untersuchungen ausgeschlossen. Als herzwirksame Medikamente entschieden wir uns für das Metoprolol, als Vertreter aus der Gruppe der Betablocker und das Ramipril aus der Gruppe der ACE-Hemmstoffe.

Anhand dieses Tiermodells sollten mit Hilfe biochemischer und –mechanischer Methoden folgende Fragen näherungsweise geklärt werden:

- Ist die Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente in Herzen mit chronischer Infarzierung verändert gegenüber herzgesunden Tieren?
- Welchen Einfluß haben Betablocker bzw. ACE-Hemmer auf die Ca^{2+} -Sensitivität der Myofibrillen und auf die maximalproduzierte Kraft?
- Wie unterscheiden sich LV und RV in ihrer veränderten Ansprechbarkeit der Myofilamente auf Calcium?
- Spielt eine Erhöhung der Phosphorylierung der MLC eine Rolle bei den untersuchten Veränderungen?

II. Material und Methoden

A. Liste verwendeter Chemikalien (in alphabetischer Reihenfolge)

Wenn nicht ausdrücklich vermerkt, stammen alle aufgeführten Chemikalien von der *Firma Serva*, Heidelberg und entsprechen dem höchsten Reinheitsgrad.

1. Aceton (2-Propanon), $\text{CH}_3\text{-CO-CH}_3$, MG 58,1g/mol
2. APS (Diammoniumperoxodisulfat), $(\text{NH}_4)_2 \text{S}_2\text{O}_8$, MG 228,20 g/mol, Firma Sigma-Aldrich, Deisenhofen
3. Bromphenolblau (3,3',5,5'-Tetrabromphenolsulfonphthalein), $\text{C}_{19}\text{H}_{10}\text{Br}_4\text{O}_5\text{S}$, MG 669,96 g/mol
4. Calciumchlorid-Dihydrat, $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, MG 147,02 g/mol
5. Coomassie Brilliant Blau®, Coomassie-Brillant-Blau R-250, Firma *Biorad*
6. Creatinkinase (CK (creatine N-phosphotransferase)), from rabbit muscle ATP, Firma *Boehringer Mannheim*
7. Creatine Phosphate, disodium salt, Firma *Boehringer Mannheim*
8. Dithioerythritol (erythro-2,3-dihydroxy-1,4-butanedithiol) $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$, MG 154,3
9. EGTA (Ethylenglycol-bis-(β -Aminoethylether)-N,N,N',N' Tetraacetic Acid) $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_{10}$, MG 380,4 g/mol, Firma *Merck*, Darmstadt
10. Essigsäure (Ethansäure), $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$, MG 60,05 g/mol
11. Ethanol (Ethylalkohol), $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, MG 46,07 g/mol
12. Glycerol (Glyzerin) $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$, MG 92,09 g/mol
13. Harnstoff (Carbonyldiamid), $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$, MG 60,06 g/mol
14. Imidazol (1,3-Diaza-2,4-Cyclopentadine) $\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2$, MG 68,08 g/mol
15. Methanol (Methylalkohol), CH_3OH , MG 32,04 g/mol
16. Metoprolol der Firma Astra Mölndal, Schweden
17. Magnesiumchlorid-Hexahydrat $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, MG 230,30 g/mol
18. Na_2ATP (Dinatrium-Adenosine-5'-triphosphat) $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_3\text{Na}_2\cdot 3\text{H}_2\text{O}$, MG 605,2
19. Natriumhydroxid, NaOH , MG 39,99 g/mol
20. Natriumazid NaN_3 , MG 65,01 g/mol
21. Phosphorsäure, H_3PO_4 , MG 98,00 g/mol
22. Ramipril der Firma Astra Mölndal, Schweden
23. Rompun 2% (Xylazinhydrochlorid)

24. SDS (Natriumdodecylsulfat), $C_{12}H_{25}NaO_4S$, MG 288,38 g/mol
25. Silver Stain Kit®, Firma *Biorad*
26. TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine), $C_6H_{16}N_2$, MG 116,2 g/mol
27. TCA (Trichloressigsäure), CCl_3CO_2H , MG 163,39 g/mol
28. TRIS-HCl (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol, hydrochloride), MG 157,39
29. Triton-x-100 1% (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol), MG ~ 625 g/mol

B. Experimentelle Tierpräparation und Studiendesign

Verwendet wurden 10 - 15 Wochen alte, männliche albino WISTAR Ratten (Gewicht 250-300g) der Marienfelder Tierlaboratorien. Es handelte sich um nach der Tierschutzverordnung vom 27. Mai 1981 (TSchV) durch die Senatsverwaltung für Gesundheit und Soziales Berlin genehmigte Versuche.

Nach Erhalt der Tiere erfolgte eine einwöchige Gewöhnungsphase an den Tierstall und an die Pflegepersonen. Die Ratten erhielten Futter und Wasser ad libitum und wurden in Käfigen zu je 5 Tieren gehalten. Einen Tag vor der OP wurden die Tiere in Einzelkäfige umgesetzt, gewogen und das Futter entfernt. Die Gabe des Wassers erfolgte weiterhin ad libitum.

Die Tierpräparation und die Operation zur Myokardinfarktinduktion erfolgte im Labor der Inneren Medizin der Charité unter Leitung von Herrn Dr. med. H. Theres: Nach intraperitonealer Mischinjektion von Ketanest (Ketaminhydrochlorid 75 mg/kgKG) und Rompun 2% (Xylazinhydrochlorid) kam es nach 5-8 Minuten zum Narkoseeintritt.

Die Myokardinfarkte (MI) wurden durch Ligatur der linken Koronararterie, wie bei *Warner et al.* beschrieben, produziert. In einem Zeitraum von 6 Wochen wurden die Ratten einer Langzeitbehandlung mit dem ACE-Inhibitor Ramipril (Astra Hässle, Mölndal, Schweden) (Gruppe A, n=17), dem β -Rezeptor Antagonisten Metoprolol (Astra Hässle, Mölndal, Schweden) (Gruppe β , n=12), einer Kombinationen aus beiden Medikamenten (Gruppe A β , n=18) (Gruppe β A, n=12) oder einer Placebogabe (Gruppe P, n=20) unterzogen. Scheinoperierte Tiere dienten als Kontrollgruppe (Gruppe SO, n=14). Die Zuteilung zu diesen Gruppen erfolgte mittels Randomisierung.

Die pharmakologische Behandlung begann am ersten postoperativen Tag. Ramipril wurde in einer Dosis von 1mg/kg Körpergewicht (KG) pro Tag im Trinkwasser verabreicht. Metoprolol wurde dem Standard Trockenfutter in einer Dosis von 350 mg/kg KG

pro Tag beigemischt. Die Fütterung der mit Medikamenten versetzten Pellets erfolgte am Nachmittag, jeweils zur gleichen Zeit. Am folgenden Morgen erhielten die Ratten, die die Medikamente vollständig zu sich genommen hatten, Wasser und Normalfutter ad libitum. Es erfolgte ein Zurückwiegen der nicht aufgenommenen Medikamente. Die kombinierte Behandlung für die Gruppe A β bestand in der Gabe von 1mg/kg KG Ramipril allein an den ersten drei post-operativen Tagen, unter Zugabe von 35mg/kg KG Metoprolol vom 4. bis 7. und 100mg/kg KG Metoprolol vom 8. bis 11. post-operativen Tag. Ab dem 12. post-operativen Tag erhielten die Tiere 350mg/kg KG Metoprolol plus 1mg/kg KG Ramipril. Gruppe β A erhielt 350mg/kg KG Metoprolol allein an den ersten drei postoperativen Tagen, unter Zugabe von 0,1mg/kg KG Ramipril vom 4. bis 7. und 0,3mg/kg KG Ramipril vom 8. bis 11. post-operativen Tag. Ab dem 12. post-operativen Tag wurde 350mg/kg KG Metoprolol plus 1mg/kg KG Ramipril verfüttert.

Zweimal in der Woche wurden die Tiere in saubere Käfige umgesetzt und einmal in der Woche gewogen, um die Medikamentendosis anzupassen. Es bestand ein Tag-/Nachtzyklus von ca 12 h heller und 12 h dunkler Phase.

6 Wochen nach Setzen des myokardialen Infarktes wurden die Ratten erneut durch intraperitoneale Injektion von 75mg/kg KG Ketaminhydrochlorid plus 7,5mg/kg KG Xylazinhydrochlorid anästhetisiert und schnellstmöglich von ihren Herzen befreit. Linker und rechter Ventrikel (LV und RV), wurden voneinander getrennt, separat gewogen, und es wurde das Verhältnis zu dem Gesamtkörpergewicht gebildet (LV/KG bzw. RV/KG). Die Infarktgrößen wurden planimetrisch durch Messung des durch Narbengewebe ersetzten Myokardiums bestimmt und als Prozent der endokardialen Zirkumferenz des gesamten LV ausgedrückt. Für die Analyse wurden Herzen mit einer Infarktgröße von <15% und >65%, sowie Herzen mit nicht-transmuraler Infarzierung ausgeschlossen.

Um zu testen, ob die Behandlung mit dem ACE-Hemmer Ramipril einen Effekt auf die Ca²⁺-Sensitivität der Myofilamente von Ratten ohne Herzinfarkt hat, wurden zusätzlich Tiere einer 3 wöchigen (Gruppe ACE 3, n=7) oder 6 wöchigen (Gruppe ACE 6, n=9) Behandlung mit Gabe von 1mg/kg KG Ramipril ausgesetzt, eine zweite Gruppe von Tieren erhielt statt der Medikation ein Placebo und wurde ebenfalls nach 3 bzw. 6 wöchiger Therapie untersucht (Kontrolle 3, n=11; Gruppe Kontrolle 6, n=13). Diese dienten damit als Kontrollgruppe. Da es sich bei dieser Versuchsreihe um eine nachgeschaltete Untersuchung handelt, sollten die Werte stets nur im Vergleich zu den

ihnen zugehörigen Kontrollgruppen gewertet werden und nicht als direkter Vergleich zu den Versuchsreihen mit myokardialer Infarzierung dienen.

C. Experimentelles Protokoll zur Untersuchung der myofilamentären Ca^{2+} -Sensitivität

1. Entfernung der Zellmembran mit Triton-x-100

Bei Permeabilisierung einer Zellmembran wird der Zugriff auf Stoffwechselforgänge des Zellinnenraumes erleichtert. Es kann so Einfluß auf das intrazelluläre Ionenmilieu genommen werden. Mit dem unten beschriebenen chemischen Häutungsverfahren können ganze Gewebestücke gehäutet werden. Durch das Detergenz Triton-x-100 werden zunächst die Zellmembranen zerstört; die Myofibrillen werden dabei nicht angegriffen.

Die grobe Präparation auf eine Größe von 250-300 μm der Muskelfaserbündel erfolgt direkt nach der Entnahme, die Feinpräparation auf die entgültige Größe (Diameter $\leq 200 \mu\text{m}$) nach der chemischen Häutung, unmittelbar vor Versuchsbeginn.

Die trabekulären Faserbündel werden für alle Gruppen aus der gleichen nicht-infarzierten Region des LV bzw. RV entnommen. Dies erfolgt auf Eis gebettet und unter Zuhilfenahme eines Mikroskopes in der Lösung A, in welcher die Faserbündel im Anschluß bei 4°C für eine Stunde inkubiert werden. Es folgt die Inkubation in der Häutungslösung bei 4°C für 5 bis 6 Stunden. Wie bei *Strauss et al.* beschrieben, werden die Fasern in dieser Lösung über Nacht bei -20°C gelagert. Am folgenden Tag werden die Faserbündel zum Entfernen der Häutungslösung zweimalig mit der Lösung A gewaschen und zur weiteren Lagerung vorsichtig mit einem Spatel in ein Eppendorfgefäß mit Lösung A gegeben.

So können sie bei einer Kühlung von -20° C bis zu 14 Tage gelagert werden.

Lösungen

Lösung A:	Glycerol	50% (v/v)
	Imidazol	20,0mM
	NaN_3	10,0mM
	ATP	5,0mM

MgCl ₂	5,0mM
DTE	2,0mM
EGTA	4,0mM
pH 7.0 bei 4°C	

Häutungslösung: Lösung A + Triton-x-100 1% (V/V)

2. Kraftmessung

Die Versuchsanordnung besteht aus einem Kraftwandler (Dehnungsmeßstreifen, force transducer KG4, Scientific Instruments, Germany), einer Wheatstone'schen Brücke (bridge amplifier BAM4C) und einem Schreiber (Yokogawa, Japan).

Im Inneren des Transducers befindet sich eine Differenzphotozelle, die für die Erzeugung des Kraftsignals der Muskelpräparate verantwortlich ist. Bei einer Auslenkung des Kraftabnehmers, z.B. durch Muskelzug, kommt es zu einer proportionalen Änderung der Photoströme in den beiden Halbzellen. Die Differenz der Änderung wird nach Ableitung in Spannungspotentiale (ΔV) an eine Meßbrücke weitergeleitet und verstärkt. Die Kalibrierung des Transducers erfolgt über Anhängen verschiedener Gewichte, entsprechend den erwarteten Kontraktionskräften.

7-10 Tage nach der oben beschriebenen Häutungsmethode werden die präparierten Muskelfasern, wie in Abbildung 5 dargestellt, isometrisch zwischen einem feststehenden Längengeber und einem Kraftabnehmer mittels einer pinzettenartigen Halterung befestigt. Die Länge der jeweiligen trabekulären Muskelfasern wird mittels der Mikrometerschraube so eingestellt, dass sich die Fasern unter minimaler Ruhespannung befinden.

Zur Überprüfung des Vordehnungszustandes wird stichprobenartig bei einigen Fasern die Sarkomerlänge anhand von Laser-Diffraktion bestimmt. Die durchschnittlichen Sarkomerlängen sind in Tabelle 2 dargestellt.

Die verwendeten Relaxations- und Kontraktionslösungen befinden sich in Plexiglasschalen mit einem definierten Volumen von 0,25-1ml Lösung und werden für die Versuche in den Halteapparat eingebracht. Der Wechsel der jeweiligen Lösungen geschieht durch Austausch der Schalen. Für die isometrische Kraftmessung werden die Fasern zunächst horizontal in ein Bad mit Relaxationslösung gehängt. Der pH wird bei Raumtemperatur (21°C) auf 7,0 eingestellt.

Der gewünschte pCa Wert wird dabei durch das Mischen der Relaxations- und Kontraktionslösung in einem bestimmten Verhältnis variiert (Strauss *et al.*, 1996). Die Relaxationslösung erhält dabei einen pCa > 8,0, die Kontraktionslösung einen pCa von 4,33. Alle Experimente werden bei 21°C (Klimaanlage) durchgeführt.

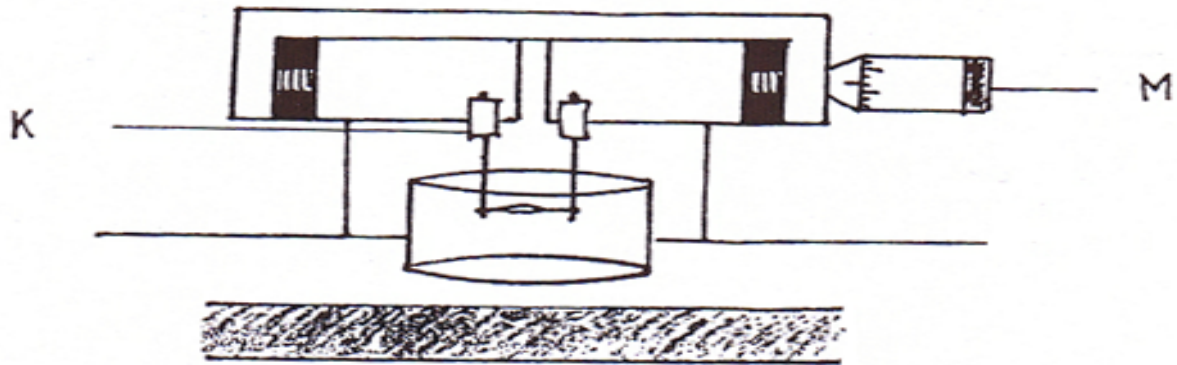


Abb. 5: Schematischer Aufbau der Apparatur für die isometrische Kraftmessung. Mit der Mikrometerschraube (M) kann die Länge der Präparate und damit der jeweilige Vordehnungszustand der Fasern variiert werden. K=Kraftwandler, F=Muskelpräparat, L=Lösung

Lösungen

Relaxationslösung:	Imidazol	30,0mM
	ATP	7,5mM
	MgCl ₂	12,5mM
	EGTA	5,0mM
	Creatinphosphat	10,0mM
	Creatinkinase	1mg/ml
	pH 7.0, 21°C	

Kontraktionslösung: Relaxationslösung + Ca Cl₂ 5mM

Nach dem Einhängen durchlaufen die Fasern eine erste Kontraktion bei maximaler Ca²⁺-Konzentration mit anschließender Relaxation. Dies soll eine gewisse Gleichschaltung der nun folgenden Kontraktionen bei maximaler Ca²⁺-Konzentration erreichen. Es ist bekannt, dass bei der ersten Kontraktion von Herzmuskelfasern bei

einem $pCa = 4,3$ mehr Zeit bis zum Erreichen von F_{max} vergeht und oft auch eine geringere maximal produzierte Kraft vorliegt als in folgenden Kontraktionen bei gleicher Ca^{2+} -Konzentration. Die Kraft-Calzium Relation wird durch anschließenden kumulativen Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration ermittelt. Der sich daraus ergebende, typische Kurvenverlauf ist exemplarisch in Abbildung 6 dargestellt.

Aus jedem Herzen werden 2-3 Faserbündel auf diese Weise untersucht.

Die Kraft-Calzium Relation, die bei $pCa\ 4,33$ maximal produzierte Kraft (F_{max}), der Hill Koeffizient (n) und die Ca^{2+} -Konzentration, die für 50% der maximalen Kraftentwicklung nötig ist (EC_{50}), werden bestimmt.

Die entstehenden Kurven werden individuell durch das Programm GPAD[®] gefittet.



Abb. 6: Charakteristischer Kurvenverlauf der Kraftentwicklung nach kumulativer Steigerung der Ca^{2+} -Konzentration. Der Verlauf ist über die Zeit dargestellt, eine genaue Erfassung der Anstiegsgeschwindigkeit erfolgte hierbei nicht.

3. Gelelektrophoretische Methoden

Gelelektrophoretische Methoden dienen der Auftrennung von Proteinen aus einem Proteingemisch bzw. der Auftrennung eines einzelnen Proteins in seine verschiedenen Isoformen. Dabei wandern die zu trennenden Moleküle unter Einfluss eines elektrischen Feldes durch ein Gel, welches in einer ionischen Pufferlösung liegt. Je nach Größe und Ladung der Moleküle bewegen sich diese unterschiedlich schnell durch das als Molekularsieb wirkende Gel. Dabei wandern kleine, negativ geladene Moleküle (Anionen) am schnellsten in Richtung der positiv geladenen Anode und positiv geladene Moleküle (Kationen) in Richtung der negativ geladenen Kathode.

3.1. Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Gelöste Proteine bilden polyvalente Ionen. Der Ladungszustand der sauren und basischen Gruppen hängt vom pH-Wert ab. Ein bestimmter pH-Wert ist dadurch ausgezeichnet, dass bei diesem pH die Zahl der positiven und negativen Ladungen eines bestimmten Proteins genau gleich sind. Das ist der isoelektrische Punkt (IP) des Proteins. Bei der IEF handelt es sich um eine Gelelektrophorese, die die Proteine nach ihrem IP trennt. Im elektrischen Feld wird unter Verwendung künstlicher Ampholyte, die sich mit ihrem positiven und negativen Pol in diesem Feld ausrichten, ein pH-Gradient aufgebaut, in dem sich das Proteinmolekül zu der Stelle bewegt, die seinem IP entspricht. Dort bleibt es liegen, da nun auf das Molekül keine Kraft mehr wirkt.

Die hier verwendete Methode der Isoelektrischen Fokussierung wurde von *O'Farrell, 1975* beschrieben.

Lösungen

Probenpuffer:	Harnstoff	9,2M
	TRIS-HCl, pH 7,5	0,01M
	Bromphenolblau (M/V)	0,002%
	Ampholine (V/V)*	2,0%
	DTE*	0,01M

Acrylamidlösung:	AA/BA (28/1,6)	0,665ml
	Aqua bidest.	1,5ml
	Ampholine	0,25ml
	Triton-x-100, 10% (V/V)	0,5ml
	Harnstoff	2,75g
	APS, 10% (M/V) *	40,0µl
	TEMED	3,5ml

* frisch zugeben

Kathodenpuffer:	NaOH	0,02 M
Anodenpuffer:	H ₃ PO ₄	0,01M

In jedem Fokussiergang laufen zum Vergleich ein relaxiertes ($pCa > 8$) und ein maximal kontrahiertes ($pCa < 4,33$) Faserbündel mit.

Die zur Aufbewahrung in Trichloressigsäure (TCA) fixierten und bei -80°C gelagerten Fasern werden langsam über 6 Stunden auf Raumtemperatur (RT) aufgetaut und durch mehrfaches Waschen mit Aceton von der Säure befreit.

Die getrockneten Präparate werden in 10 bzw 20 µl Probenpuffer (je nach späterer Silber- oder Coomassiefärbung) für 1 Stunde bei RT inkubiert. Die Acrylamidlösung (3,3%) wird gemischt und der Harnstoff mittels Handwärme gelöst. Nach Entgasen der Lösung für 5 Minuten, wird sie bis zu einer Markierung von 7,5 cm in Kapillaren aufgezogen und bei RT für 1,5 Stunden zum Polymerisieren stehengelassen.

Die Probenaufbereitung erfolgt in 20 µl Probenpuffer in einem Mikrohomogenisator, so dass sich eine Konzentration von 1 mg Protein/ml Probenpuffer ergibt. Wärmebildung ist dabei unbedingt zu vermeiden. Nach kurzem Abzentrifugieren erfolgt ein nochmaliges Extrahieren für 1 Stunde bei RT.

Der IEF-Vorlauf erfolgt bei Überschichtung der in der Fokussierkammer (Serva) eingespannten Rundgele mit 30 µl Probenpuffer und einer Einstellung von 300 V für 30 Minuten. Die Zentrifugation der Proben erfolgt bei 14500 U/min, 20°C für 10 Minuten. Der gesamte Proteinextrakt wird nach Abpipettieren der Pufferreste von der Geloberfläche auf diese aufgetragen, vorsichtig mit 25 µl Probenpuffer und anschließend mit Kathodenpuffer überschichtet. Für 15 Stunden wird eine konstante

Spannung von 400 V bei RT angelegt. Nach Ende der Laufzeit werden die Gelröhrchen bis zum Lauf der 2. Dimension bei -20°C eingefroren.

Zur Kontrolle des pH-Gradienten wird auf eines der Gele statt der Probe nur Probenpuffer aufgetragen. Im Anschluß an die Fokussierung kann nun das Gel in 0,5 cm lange Stücke geschnitten und bei RT für 1-2 Stunden in Aqua bidest. equilibriert werden. Der jeweilige pH-Wert kann so bestimmt werden.

3.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2.Dimension)

Die Auftrennung von Proteingemischen in 2 Dimensionen bedeutet eine Auftrennung nach dem Isoelektrischen Punkt (IP) und nach dem apparenten Molekulargewicht. Es können dabei Proteine des gleichen Molekulargewichtes, Isoformen eines Proteins sowie verschiedene Phosphorylierungsformen getrennt werden. Als Trennmedium bei dieser Art der Elektrophorese dient ein Gel auf Polyacrylamidbasis. Bisacrylamid dient dabei zur Quervernetzung der ansonsten linearen Polyacrylamid-Ketten.

Die erste Dimension stellt in diesem Fall die oben erwähnte IEF dar. Die fokussierten Gele werden auf ein vertikales, diskontinuierliches Flachgel (2. Dimension) aufgebracht und mit einem Agarosepuffer fixiert. Durch Anlegen eines konstanten Stromes erfolgt die Auftrennung nach dem Molekulargewicht. Isoformen eines Proteins und verschiedene Phosphorylierungsformen liegen in dem gefärbten Gel als Punkte nebeneinander.

In der vorliegenden Arbeit wurde die 2D-Gelelektrophorese zur Auftrennung der Phosphorylierung der leichten Ketten des Myosins (MLC_{20}) durchgeführt.

Durch die Variation der Acrylamid/Bisacrylamid-Konzentration kann die Porengröße des Gels verändert und somit der aktuellen Fragestellung unmittelbar angepaßt werden. Zur Auftrennung von größeren Molekülen ist eine geringere Konzentration Acrylamid erforderlich, als für kleinere. Die Stammlösung (AA/BA) hat eine Konzentration von 30% AA (M/V) und 0,8% BA (M/V) ($\text{AA/BA} = 30/0,8$). Ammoniumpersulfat (APS) dient als Reaktionsstarter und TEMED als Polymerisierungskatalysator. DTE und SDS (Natriumdodecylsulfat) sind als Zugabe in dem Probenpuffer nötig, um den Einfluß von Konfiguration und verbleibender Ladung der Moleküle zu minimieren. Dem DTE kommt dabei die Aufgabe der Disulfidbrückenspaltung in der Tertiärstruktur der Proteine und

dem Schutz der entstandenen freien SH-Gruppen zu. Die Proteine werden dadurch in weitere Untereinheiten aufgespalten. Zusätzlich kommt SDS (Natriumdodecylsulfat) zum Einsatz. Dieses anionische Tensid (Detergenz) lagert sich an diese Strukturen an und überdeckt so die Eigenladungen von Proteinen. Pro 1 g Protein binden ungefähr 1,4 g SDS, so dass die Proteine eine konstante Ladungsverteilung aufweisen.

Für 4 Gele werden 30ml Trenngelmischung (15%) angesetzt und in den Elektrophoresegelesystemen (Biometra) für 0,5-1 Stunde polymerisiert. In diesem Zustand können die Gele nach ausreichender Polymerisierung zur Aufbewahrung für 1-2 Tage bei 4-8°C gelagert werden. Nach sorgfältiger Spülung der Trenngeloberfläche mit Aqua bidest. wird das Sammelgel mit ca. 0,8cm Sammelgelmischung (3,3%) überschichtet. Die Polymerisierung beträgt 0,5-1 Stunde bei RT. Nachdem die Acrylamid-Lösungen zwischen den Platten polymerisiert sind, werden die im SDS-Probenpuffer für 8-10 Minuten equilibrierten, gefrorenen IEF-Rundgele auf die Oberfläche des flachen Sammelgels aufgetragen. Anschließend erfolgt die Fixierung mit flüssiger Agarose. Durch Anlegen einer Spannung bei konstanter Stromstärke (10mA pro Gel bis die Lauffront das Sammelgel passiert hat, dann Erhöhen auf 15mA pro Gel) laufen die Proteine von der Kathode (-) zur Anode (+). Die Elektrophorese wird beendet, sobald die Lauffront mit dem zugesetzten Farbstoff Bromphenolblau das Gel durchlaufen hat. Anschließend werden die aufgespaltenen Proteine im Gel durch Färbung sichtbar gemacht (Coomassiefärbung oder Silberfärbung)

Lösungen

SDS-Probenpuffer:	Harnstoff, 4,0M	2,4g
	TRIS-HCl, pH 6,82, 2M	250µl
	SDS, 20% (M/V)	500,0µl
	Aqua bidest.	ad. 10,0ml
	Bromphenolblau, 0,002%	(M/V)
	DTE*, 0,5M	10,0µl

1% Agarose-Lösung: entspricht SDS- Probenpuffer ohne Harnstoff; 0,5g Agarose auf 50ml Probenpuffer

Trenngel-Lösung: Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30/0,8), (V/V) 14,6ml

	Trenngelpuffer, 1,5M, pH 8,8	7,5ml
	Aqua bidest.	6,25ml
	Glycerin/Aqua bidest. 1:1	1,5ml
	APS, 10% (M/V) *	150,0µl
	TEMED	15µl
Trenngelpuffer, pH 8,8	TRIS, 2M, pH 8,8 (4*konz.)	187,5ml
	SDS (20%) (M/V)	5,0ml
	Aqua bidest.	57,5ml
Sammelgel-Lösung	AA/BA (30/0,8) (V/V)	0,550ml
	Sammelgelpuffer, 1,0M, pH 6,8	0,625ml
	Aqua bidest.	3,77ml
	APS, 10% (M/V) *	50,0µl
	TEMED	5µl
*frisch dazugeben		
Sammelgelpuffer, pH 6,8 (8*konz.)	TRIS, 2M, pH 8,8	125,0ml
	SDS (20%) (M/V)	10,0ml
	Aqua bidest.	115,0ml
Laufpuffer, pH 8,3 (10*konz.)	TRIS-Base, 250mM	60,56g
	Glycin, 1,92M	288,3g
	SDS (20%) (M/V)	100,0ml
	Aqua bidest.	2000,0ml

Färbemethoden

Entscheidend ist die Empfindlichkeit und die Reversibilität der Färbung.

1. Coomassie Brillant Blau ®

Der Farbstoff lagert sich an die basischen Seitenketten der Aminosäuren an und färbt damit die Proteine (unspezifisch) an. Hierbei handelt es sich um eine reversible Färbung von Proteinen. Die minimal anfärbbare Proteinkonzentration beträgt zwischen 0,1-0,5µg/mm².

0,5-1 Std. Inkubation in Färbelösung

0,5-1 Std. Entfärber 1

über Nacht Entfärber 2

Färbelösung	Coomassie Brillant Blau ®, 0,25M%	8Tbl.
	Methanol, 40V%	200ml
	Essigsäure, 98%	50ml
	Aqua bidest.	250ml
Entfärber-Lösung 1	Ethanol, 96%, vergällt,	1000ml
	Essigsäure, 98%	140ml
	Aqua bidest.	860ml
Entfärber-Lösung 2	Ethanol, 96%, vergällt,	100ml
	Essigsäure, 98%	140ml
	Aqua bidest.	1760ml

Nach der Färbung des Gels wird die nicht an Proteine gebundene, überschüssige Farbe durch die Entfärber-Lösungen ausgewaschen.

2. Silberfärbung

Diese Methode ist irreversibel. Die Proteine werden schon ab einer Konzentration von 0,05-2ng/mm² angefärbt. Es werden Lösungen aus dem ‚Silver Stain Kit‘[®] der Firma Biorad verwendet.

Bei vorhergehender Coomassie-Färbung[®] der Gele sind diese gründlich zu entfärben (Entfärber 1 über Nacht). Das ungefärbte und in 10% Ethanol o. Methanol/7% Eisessig fixierte Gel wird durch Zugabe von $K_2Cr_2O_7$ einem Oxidationsprozess unterworfen (5 Min.). Durch die Behandlung mit dieser Lösung werden die Proteine im Gel denaturiert und fallen somit aus. Dadurch wird ein weiteres Wandern der Proteine im Gel verhindert. Nach dem Entfernen des überschüssigen Oxidationsmittels werden die Gele für 30 Minuten in Silberreagenz-Lösung inkubiert. Durch Zugabe von Entwickler-Lösung (Na_2SO_3) werden die Ag^+ -Ionen zu elementarem Ag reduziert und ausgefällt. Dieses färbt die Stellen, an denen Proteine vorhanden sind schwarz.

Die gefärbten Gele werden mit einem Durchlichtdensitometer (Biorad Scanning Densitometer, Modell 1650) ausgewertet.

3.3. Auswertung der Gelelektrophoresen

Der Grad der Phosphorylierung der leichten Ketten des Myosins lässt sich mit der 2-dimensionalen Elektrophorese feststellen, wenn man davon ausgeht, dass die Phosphorylierung bestimmter Aminosäuren durch die negative Ladung des Phosphatrestes den IP des Moleküls verändert. Die weitere Phosphorylierung durch eine zweite Aminosäure führt zu einer weiteren Verschiebung des IP in Richtung des sauren Milieus.

Um eine Dephosphorylierung während der Präparation und Verarbeitung zu verhindern, werden die Fasern schnellstmöglich in 15%iger Trichloressigsäure (TCA) in Aceton bei $-80^{\circ}C$ fixiert und in dieser Lösung anschließend bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

Bei der Auswertung der Gele durch das Durchlichtdensitometer werden Absorptionskurven der Proteinspots, die den unphosphorylierten (U-MLC) bzw. phosphorylierten (P-MLC) regulatorischen leichten Ketten des Myosins entsprechen, erstellt. Der Phosphorylierungsgrad wird folgendermaßen errechnet:

$$\% \text{ P-MLC} = \frac{\text{P-MLC}}{\text{P-MLC} + \text{U-MLC}} \times 100.$$

4. Messung der Sarkomerlängen mittels Laser-Diffraktion

Viele Variablen nehmen Einfluß auf die Ca^{2+} -induzierte Kraft in gehäuteten Fasern. Die Ca^{2+} -Sensitivität, wie auch die maximal produzierte Kraft der Myofibrillen stehen unter dem Einfluß der SL (*Linz et al., 1989*).

Infolge seiner Querstreifung wirkt der Muskel als optisches Gitter, wobei die Z-Scheiben, die die Sarkomere zu beiden Seiten begrenzen, als „Gitterstäbe“ dienen. Die Z-Scheiben können damit als Streuquellen angesehen werden, an denen das einfallende Licht in verschiedene Richtung gestreut wird. Bestimmte Streuwinkel bringen die Wellen des Streulichtes in Phase. Es kommt zu einer Überlagerung des an mehreren Z-Scheiben gestreuten Lichtes und damit zu einem lokalen Maximum. Dies kann auf dem Projektionsschirm als Lichtfleck registriert werden. Das erste Intensitätsmaximum wird dort auftreten, wo der Phasenunterschied einer ganzen Wellenlänge entspricht, das zweite dort, wo es zwei ganze Wellenlängen sind usw. mittels Laser-Diffraktion wurden stichprobenartig die SL in den verschiedenen Gruppen berechnet.

Die Abbildung 7 zeigt schematisch den Aufbau der Versuchsanordnung.

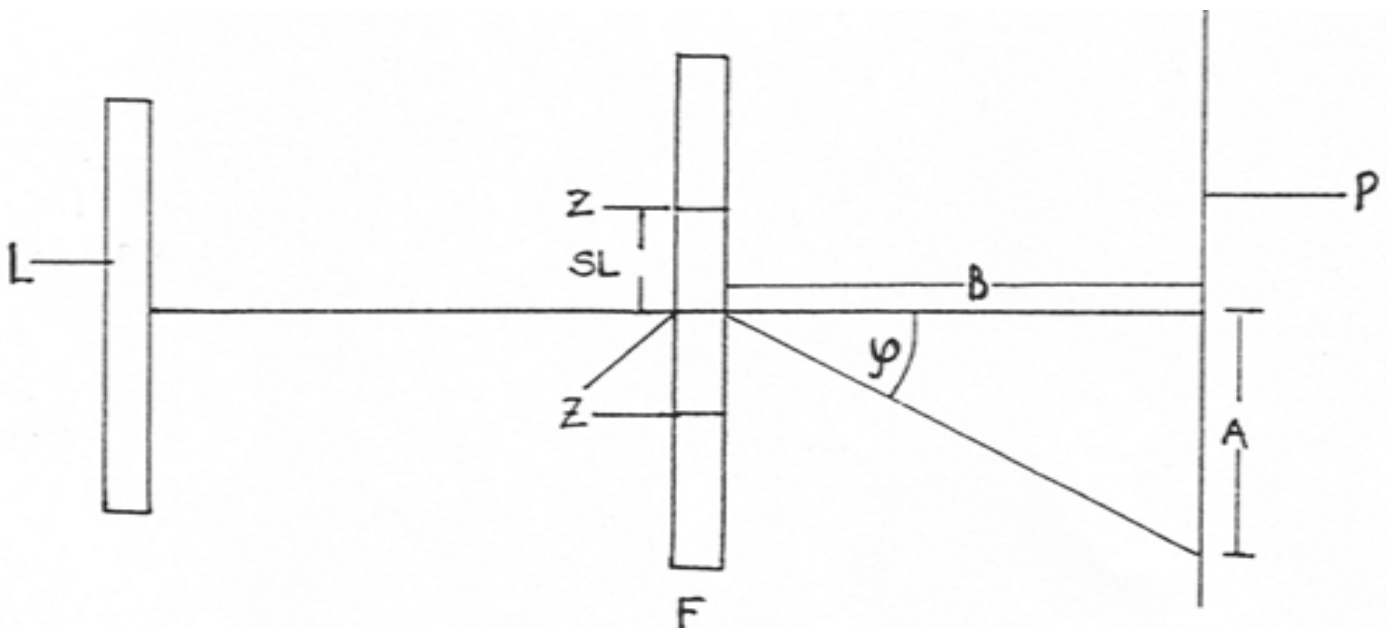


Abb. 7: Schem. Versuchsanordnung zur Ermittlung der SL. L=Laser, F=Faserbündel, Z=Z-Scheibe, SL=Sarkomerlänge, B=Abstand Faserbündel-Projektionsschirm, P=Projektionsschirm, A= Abstand der Lichtpunkte (mm), λ =Wellenlänge Laser (420nm), φ =Streuwinkel.

Es wurde folgende Formel zur Berechnung der Sarkomerlängen verwendet:

$$\lambda = \sin \vartheta \cdot \text{s.l.}$$

$$A = \sin \vartheta \cdot \sqrt{A^2 \cdot B^2}$$

$$\Rightarrow \lambda / \text{s.l.} = \sin \vartheta$$

$$\Rightarrow \sin \vartheta = A / \sqrt{A^2 \cdot B^2}$$

$$\Rightarrow \lambda / \text{s.l.} = A / \sqrt{A^2 \cdot B^2}$$

$$\Rightarrow \text{s.l.} = \lambda \cdot \sqrt{A^2 \cdot B^2} / A$$

C. Statistische Testverfahren

Die Kraft-Calzium-Beziehung, also die Berechnung der pCa₅₀ Werte und Hill Koeffizienten wurde mittels nicht-linearer Regressionsanalyse unter Verwendung der PC-Software Graph Pad 2.0[®] des „Institute for Scientific Information“ angepaßt.

Gleichung: Kraft (F) = F_{min} + (F_{max}-F_{min}) / 1+10^{log (EC50-x) n_H}, wobei n_H = HILL Koeffizient.

Alle Daten werden als Mittelwerte ± SEM (standart error of the mean) bzw in den durch Boxplots dargestellten Grafiken als Median aus n Experimenten angegeben. Die statistische Analyse der Unterschiede zwischen den Gruppen wurde mit dem Kruskal-Wallis-H Test für nicht parametrische, unverbundene Stichproben berechnet. Als posthoc-Test erfolgte die Analyse zwischen den Gruppen mit dem Mann-Whitney-U Test für nicht parametrische, unverbundene Stichproben. Eine Normalverteilung konnte aufgrund durchgeführten QQ-Plots für alle Stichprobenmengen ausgeschlossen werden. Als statistisch signifikant wurden Werte von p<0,05 akzeptiert.

III. Ergebnisse

A. Einfluß der Infarktgröße auf das Körpergewicht

Die allgemeinen Charakteristika der Versuchstiere finden sich in Tabelle 1 und sind Grundlage für die im Folgenden aufgeführten Erläuterungen. Tiere mit planimetrisch errechneten Infarktgrößen $< 15\%$ und $> 65\%$, sowie nicht erfolgter oder nicht-transmuraler Infarzierung wurden aus der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Bezüglich der Infarktgrößen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Auf die Messung von Lungen- und Lebergewicht als klinische Parameter für eine bestehende Herzinsuffizienz wurde hier verzichtet.

In den Gruppen mit chronischer myokardialer Infarzierung konnte, unabhängig von der gegebenen Medikation, eine signifikante Verminderung des Körpergewichtes (KG) im Vergleich zu sham operierten Tieren (SO) beobachtet werden. Betrachtet man nur die Gruppen mit myokardialer Infarzierung, so zeigt sich in der mit dem ACE-Hemmstoff behandelten Gruppe (A) ein signifikant höheres Gesamtkörpergewicht (KG) im Vergleich zu der mit dem Betablocker behandelten (β) und der Kombinations-behandelten Gruppe A β . Ein ähnlich gearteter Unterschied gegenüber der Gruppe β A ist ebenfalls im Trend erkennbar, allerdings ohne statistische Signifikanz zu erreichen. Weiterhin besteht ein deutlicher Unterschied zwischen den Placebo behandelten Tieren (P) und den Tieren der Gruppe β , β A und A β mit einem signifikant höheren Gesamtkörpergewicht in P.

Der Sachverhalt ist in Abbildung 8 schematisch dargestellt.

Gruppe/ Parameter	A	β	A β	β A	P	SO
Zahl der Versuchstiere (n)	17	15	18	14	20	14
Infarktgröße (%)	38.6 \pm 3.2	36.6 \pm 2.8	36.2 \pm 3.8	37.1 \pm 4.0	43.2 \pm 2.5	--

Gruppe/ Parameter	A	β	Aβ	βA	P	SO
Körpergew. (KG) (g)	348±5.5 ○	325±5.7 ○ £ x	325±4.8 ○ £ x	334±6.6 ○	351±6.3 ○	380±4.5
LV/ KG (mg/g)	2.53±0.1 * •	2.58±0.41 * •• #	2.36±0.05 *	2.40±0.06 *	2.52±0.06 * ••	2.12±0.03
RV/ KG (mg/g)	0.86±0.1 •• †	1.03±0.32 †	0.82±0.05 •• †	0.82±0.06 •• †	0.99±0.05 †	0.55±0.02

Tab 1: Allgemeine Charakteristika der Versuchstiere. SO: sham operierte Tiere. Tiere mit Myokardinfarkt (MI): P: Placebo behandelt; A: Ramipril behandelt; β: Metoprolol behandelt; Aβ: Ramipril als Monotherapie 3 d postoperativ, gefolgt von einer Kombinationsbehandlg aus Metoprolol + Ramipril; βA: Metoprolol als Monotherapie 3 d postoperativ, gefolgt von einer Kombinationsbehandlg mit Ramipril + Metoprolol; KG: Körpergewicht; LV: linker Ventrikel; RV: rechter Ventrikel.

KG: ○ p<0,01 vs SO; £ p<0,01 vs A; x <0,01vs P. LV/KG und RV/KG: * p<0,01 vs SO; • p<0,05 vs Aβ; •• p<0,01 vs Aβ; # <0,05 vs βA; •• p<0,05 vs β; † p<0,01 vs SO.

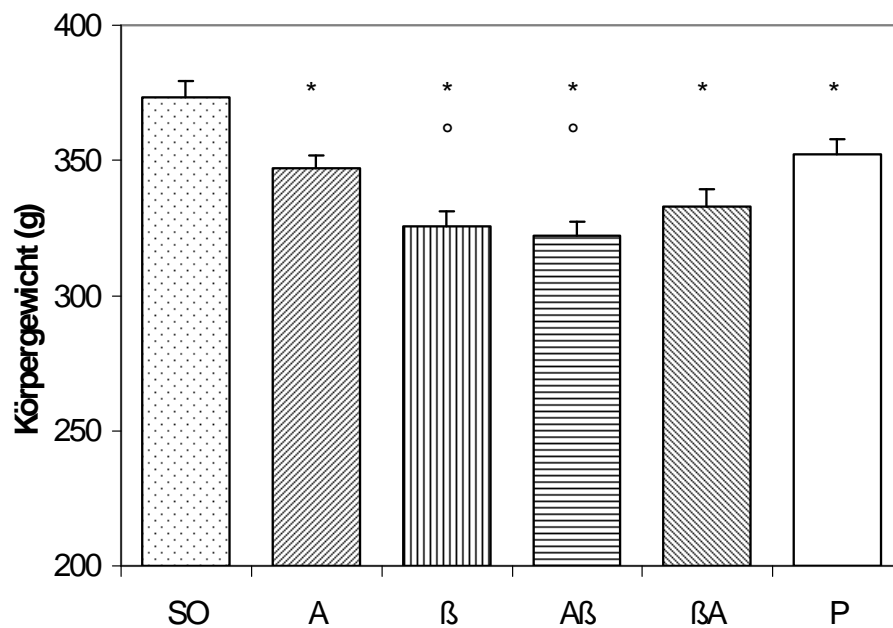


Abb. 8: Körpergewicht (in g) von Tieren mit myokardialer Infarzierung (MI) vs sham operierter Tiere (SO). *:p<0,05 vs SO; •:p<0,05 vs A und P. Dargestellt als Mittelwerte ± SEM.

B. Charakterisierung der permeabilisierten Präparate beider Ventrikel

An die permeabilisierten Präparate wurde folgende Bedingung gestellt:

1. Mikromolare Konzentrationen von Calcium sollten eine Kontraktion auslösen
2. Das Anbringen der permeabilisierten Fasern an die beiden Kraftabnehmer sollte ohne Einfluß auf die SL und damit auf den Vordehnungszustand geschehen

C. Sarkomerlängenbestimmung per Laser-Diffraktion

Mittels Laser-Diffraktion wurde stichprobenartig etwa ein Drittel aller Fasern der jeweiligen Gruppen nach dem Befestigen an dem Myographen auf die SL hin geprüft. Wie Tabelle 2 zeigt, sind die SL zwischen den Gruppen beider Ventrikel nicht signifikant verschieden, so dass wir annehmen können, dass dies nicht zu den von uns ermittelten Unterschieden in der Ca^{2+} -Sensitivität beiträgt.

Gruppe/ Parameter	A	β	Aβ	βA	P	SO
Zahl der Versuchstiere (n)	17	15	18	14	20	14
SL (μm)	1.83±0.02	1.89±0.03	1.85±0.02	1.84±0.03	1.85±0.04	1.83±0.03
F _{max} (mN/mm ²)	24.2±2.4 **	32.3±5.1 *	25.4±1.9 **	28.1±3.2 **	27.4±3.9 **	47.6±6.1
EC ₅₀	5.12±0.02	5.16±0.01 *	5.12±0.01 •	5.19±0.02 *	5.13±0.02	5.11±0.02
HILL	5.1±0.4	4.5±0.3 *	4.8±0.3	4.0±0.2 ; **	4.0±0.2 ; **	5.8±0.8

Tab 2: Sarkomerlängen und Parameter des Kraft- Ca^{2+} -Beziehung von gehäuteten Fasern des LV.

*p<0.05 vs SO; **p<0.01 vs SO; • p<0.05 vs βA; ; p<0.05 vs A.

D. Parameter des LV- Gruppen mit chronischer myokardialer Infarzierung (MI) vs sham operierter Herzen (SO)

1. Reaktive myokardiale Hypertrophie

Eine myokardiale Hypertrophie der Ventrikel wurde gemessen an dem Verhältnis Ventrikelgewicht / Körpergewicht (LV/KG bzw. RV/KG).

Linksventrikulär konnten wir ein erhöhtes relatives Herzgewicht aller Gruppen mit chronischer myokardialer Infarzierung im Vergleich zur sham operierten Gruppe beobachten. Dies war unabhängig von der gegebenen Medikation. Eine Behandlung mit dem ACE-Hemmer oder dem Betablocker als Monotherapie erbrachte im Vergleich zur Gruppe P keine Veränderung des relativen Herzgewichtes, auch bestand im Vergleich der beiden Gruppen (A + β) miteinander kein Unterschied (A: $2,53 \pm 0,1$; β : $2,58 \pm 0,41$; P: $2,52 \pm 0,06$). Es zeigte sich aber eine signifikante Verringerung des Hypertrophiegrades von Tieren der Gruppe A β ($2,36 \pm 0,05 \text{ mg/g}$) im Vergleich zu Tieren der Gruppen A, β und P. Im Trend ließ sich diese Verringerung des Ventrikelgewichtes auch für die Gruppe β A ($2,40 \pm 0,06$) nachvollziehen, signifikant war dieser Unterschied allerdings nicht.

Der Sachverhalt ist in Tabelle 1 bzw. in Abbildung 9 dargestellt.

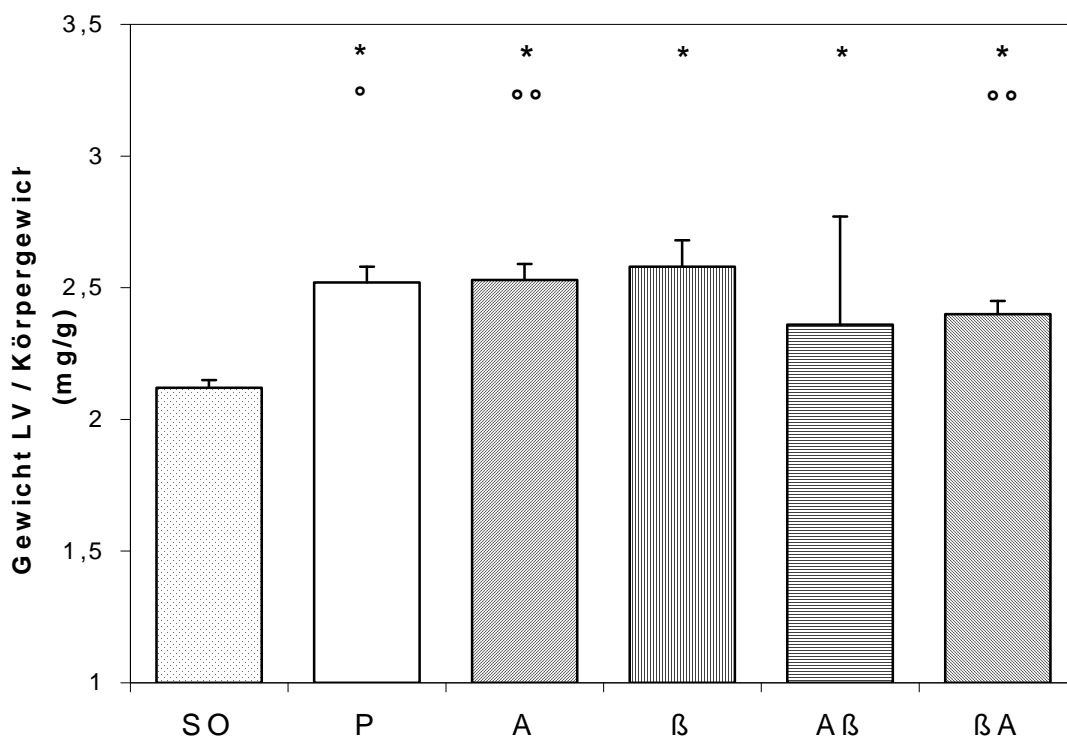


Abb.9: Verhältnis linksventrikuläres Gewicht zu KG (LV / KG ratio).
 *: $p < 0,01$ vs SO;
 ◦: $p < 0,05$ vs A β ;
 ◦◦: $p < 0,01$ vs A β . Werte dargestellt als Mittelwerte \pm SEM.

2. Kraft-Ca²⁺-Beziehung

Um die Ca²⁺-Sensitivität der Kraftentwicklung näher zu untersuchen, wurde die produzierte Kraft in der oben beschriebenen Weise unter Zugabe einer definierten, steigenden Ca²⁺-Konzentration gemessen. Das Verhältnis wurde im Vergleich zu F_{max} in Prozente umgerechnet und ist in den Abbildungen 10a-c dargestellt.

2.1. Sham operierte Tiere (SO) versus Placebo-behandelte Tiere mit myokardialer Infarzierung (P)

Bezogen auf den EC₅₀-Wert zeigte sich im Bereich des LV kein signifikanter Unterschied der Ca²⁺-Sensitivität der Myofibrillen zwischen der Placebo behandelten und der sham operierten Gruppe. Die Steigung der Gruppe P hingegen war im Vergleich zu der Gruppe SO signifikant erniedrigt. Dargestellt wird dies in einer Erniedrigung des Hill Koeffizienten von 5,8±0,8 in SO auf 4,0±0,2 in P. Dies spiegelt sich in den Werten der relativen Kraft bei niedrigen Calciumkonzentrationen wieder (bei pCa 5.22 betrug die Kraft 33.2% ± 2.9 für P vs 26.6% ± 4.4 für SO; alle Werte sind in Relation zu F_{max} gesetzt).

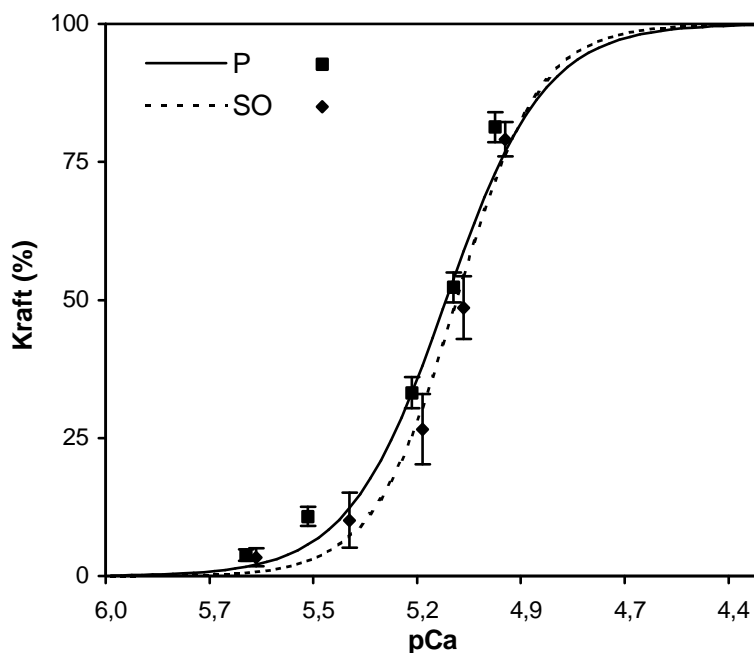


Abb 10a: Kraft-Ca²⁺-Beziehung der Gruppe SO vs P des LV. Es zeigte sich ein signifikant erniedrigter HILL Koeffizient (n_H) der Gruppe P, bei gleichem EC₅₀-Wert. Die Kraft wurde normiert auf die maximale Kraftentwicklung bei pCa 4,33.

$$n_H (P) = 4,0 \pm 0,2$$

$$n_H (SO) = 5,8 \pm 0,8; p < 0,01$$

2.2. Kraft-Ca²⁺-Beziehung nach myokardialer Infarzierung unter medikamentöser Therapie

In A läßt sich ein signifikanter Anstieg der Steigung der Kraft-Ca²⁺-Kurve im Vergleich zu P von $4,0 \pm 0,2$ auf $5,1 \pm 0,4$ verzeichnen. Die Ca²⁺-Sensitivität bleibt hierbei jedoch unverändert. Dargestellt ist dieser Zusammenhang in Abbildung 10b. Für die Gruppe A β läßt sich im Trend ebenfalls ein leichter, aber nicht signifikanter Anstieg der Steigung auf $4,8 \pm 0,3$ bei gleichbleibender Ca²⁺-Sensitivität verzeichnen (nicht dargestellt).

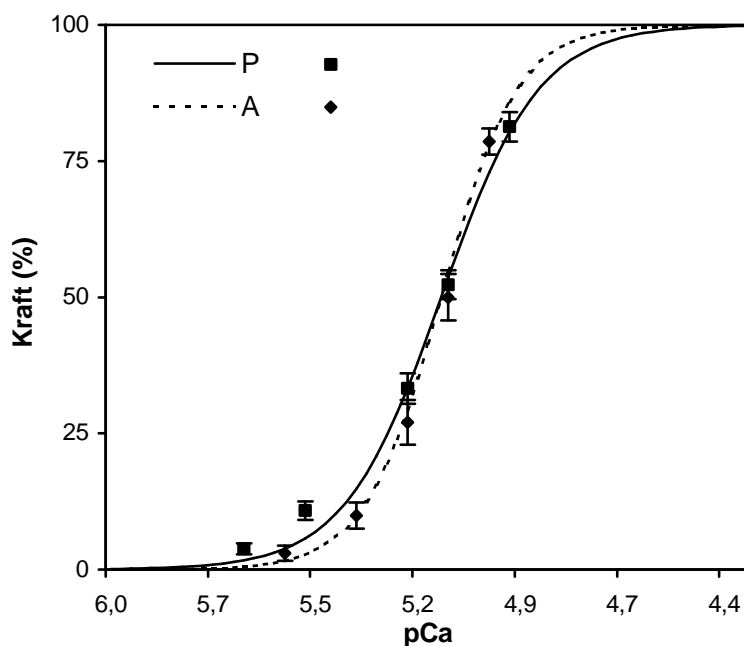


Abb 10b: Kraft-Ca²⁺-Beziehung von Gruppe A vs P. Bei gleichen EC₅₀-Werten Erhöhung des HILL Koeffizienten (n_H) in A.

$$n_H (P) = 4,0 \pm 0,2$$

$$n_H (A) = 5,1 \pm 0,4; p < 0,05$$

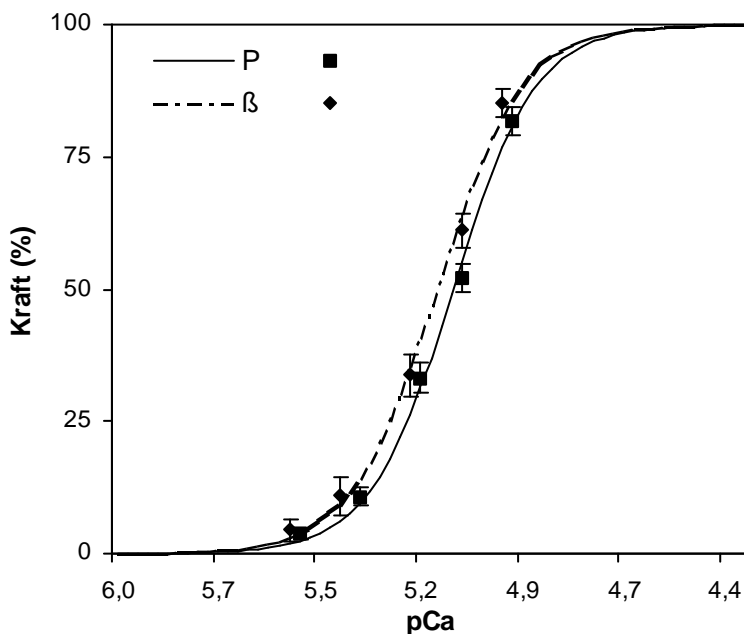


Abb 10c: Kraft-Ca²⁺-Beziehung von Gruppe β vs P. Bei gleichem HILL Koeffizienten (n_H) Erhöhung des EC₅₀-Wertes in β .

$$EC_{50} (P) = 5,13 \pm 0,02$$

$$EC_{50} (\beta) = 5,16 \pm 0,01; p < 0,05$$

Im Gegensatz dazu wurde die Ca^{2+} -Sensitivität in den Gruppen β und βA im Vergleich zu der Gruppe SO und P signifikant erhöht (EC_{50} β : $5,16 \pm 0,01$; βA : $5,19 \pm 0,02$; SO: $5,11 \pm 0,02$; P: $5,13 \pm 0,02$). Der HILL Koeffizient blieb in den Gruppen β und βA im Vergleich zu P jedoch unverändert. Die Werte der relativen Kraft bei niedrigen Calciumkonzentrationen spiegeln dies wider (bei pCa 5.22 betrug die Kraft in β : $33,7\% \pm 4,0$; in βA : $40,5\% \pm 4,6$ versus $33,2\% \pm 2,9$ in P). Die Abbildung 10c stellt die diesen Zusammenhang für die Gruppe β im Vergleich zu P dar.

Es besteht eine Ähnlichkeit im Verhalten der Gruppen A und $\text{A}\beta$, sowie β und βA bzgl. der Ca^{2+} -Sensitivität und des HILL Koeffizienten.

3. Die maximal produzierte Kraft

Die bei pCa 4,33 maximal entwickelte Kraft (F_{max}) der Fasern des LV wurde in mN/mm^2 bestimmt und ist in Abbildung 11 dargestellt. Es konnte eine signifikant geringere Kraftentwicklung aller Gruppen mit myokardialer Infarzierung, unabhängig von der gegebenen Medikation, im Vergleich zur Gruppe SO verzeichnet werden. Der Vergleich der Gruppen mit MI untereinander erbrachte keinen weiteren Unterschied bzgl. der maximal entwickelten Kraft.

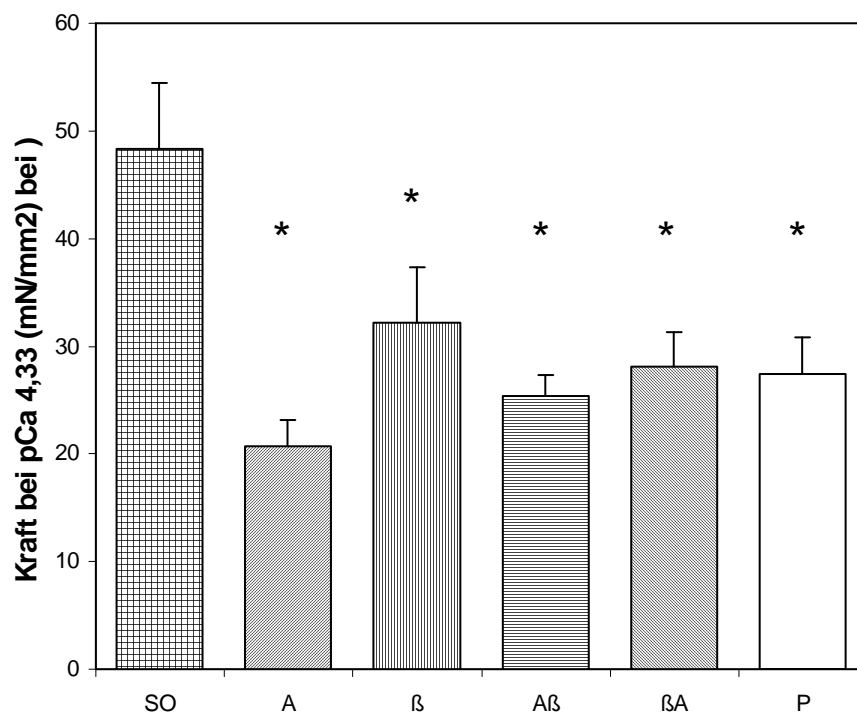


Abb 11: Maximal entwickelte Kraft (F_{max}) von Fasern des LV verschiedener Gruppen mit MI vs SO.

*: $p < 0,05$ vs SO. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

E. Parameter des RV- Gruppen mit chronischer myokardialer Infarzierung (MI) vs sham operierte Herzen (SO)

1. Reaktive myokardiale Hypertrophie

Eine signifikante rechtsventrikuläre Hypertrophie, gemessen am relativen Herzgewicht (RV/KG), konnte, wie bereits für den LV beschrieben, in allen Gruppen mit chronischer myokardialer Infarzierung im Vergleich zu sham operierten Tieren verzeichnet werden. Dieser Unterschied wurde auch durch die gegebene Medikation nicht verändert. Der Sachverhalt ist in Tabelle 1 und Abbildung 12 dargestellt.

Vergleicht man nur die Gruppen mit MI miteinander, zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen A, A β und β A im Vergleich zur Gruppe β (A: $0,86 \pm 0,1$; A β : $0,82 \pm 0,05$; β A: $0,82 \pm 0,06$ versus β : $1,03 \pm 0,32$), wobei β das höchste relative Herzgewicht aufweist und sich diesbezüglich nicht signifikant von Gruppe P ($0,99 \pm 0,05$) unterscheidet.

Zwischen den beiden Gruppen mit einer Kombinationsbehandlung aus ACE-Inhibitor und Betablocker bestand kein Unterschied. Die unterschiedliche Reihenfolge der postoperativen Medikamentengabe der Gruppen A β und β A führte also auch im Bereich des RV zu keiner Veränderung der RV/KG Ratio.

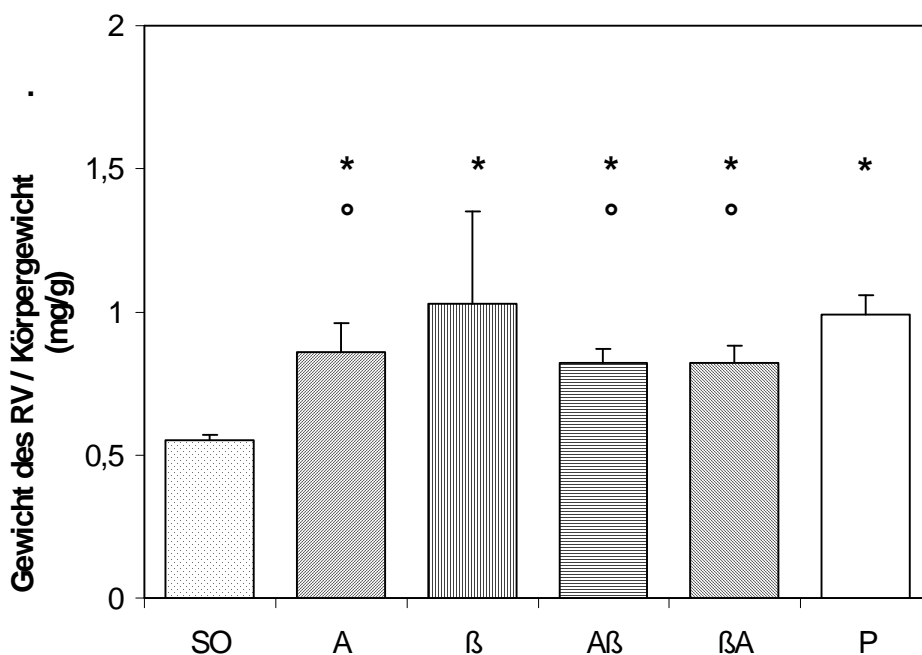


Abb 12: Verhältnis von rechtsventrikulärem Gewicht zu KG (RV/KG ratio). *: $p < 0,01$ vs SO; \circ : $p < 0,05$ vs β . Werte dargestellt als Mittelwerte \pm SEM.

2. Kraft-Ca²⁺-Beziehung des RV

2.1. Sham operierte Tiere (SO) versus Placebo-behandelte Infarkttiere (P)

Es zeigte sich, wie schon im Bereich des LV gesehen, kein signifikanter Unterschied in der Ca²⁺-Sensitivität der Myofibrillen zwischen den Gruppen P und SO (P: 5,19±0,03; SO: 5,14±0,03). Dies wird durch die ähnlichen EC₅₀-Werte bestätigt. Anders als im Bereich des LV, ist hier die Steigung der Gruppe P im Vergleich zu SO, aufgrund der stark streuenden Werte, nicht signifikant erniedrigt. Tabelle 3 stellt diesen Sachverhalt dar.

Gruppe/ Parameter	A	ß	Aß	ßA	P	SO
Zahl der Versuchs- tiere (n)	17	15	18	14	20	14
SL (µm)	1.84±0.02	1.88±0.02	1.85±0.02	1.85±0.03	1.84±0.02	1.84±0.02
F _{max} (mN/mm ²)	18.6±1.7 *	25.2±4.6	26.7±3.9	20.7±2.7	22.8±3.4	39.2±8.3
EC ₅₀	5.21±0.03	5.18±0.03	5.22±0.04	5.20±0.04	5.19±0.03	5.14±0.03
HILL	4.3±0.5	4.1±0.9	3.7±0.4	4.2±0.9	4.65±0.8	5.13±1.1

Tab 3: Parameter der Kraft-Ca²⁺-Beziehung von gehäuteten Fasern des RV. F_{max}: *p<0.05 vs SO; keine signifikanten Unterschiede der EC₅₀-Werte oder HILL Koeffizienten im Vergleich der Gruppen miteinander.

2.2. Kraft-Ca²⁺-Beziehung nach myokardialer Infarzierung und unter medikamentöser Therapie

In den mit dem ACE-Inhibitor und den mit dem Betablocker behandelten Gruppen des RV konnte keine signifikante Änderung bzgl. der Ca²⁺-Sensitivität oder des HILL

Koeffizienten im Vergleich zu der Placebo behandelten oder der sham operierten Gruppe verzeichnet werden.

3. Die maximal produzierte Kraft

Die bei pCa 4,33 maximal entwickelte Kraft (F_{\max}) der Fasern des RV wurde in mN/mm^2 bestimmt und ist in Abbildung 13 dargestellt. Es konnte eine signifikant niedrigere Kraft in A im Vergleich zu SO verzeichnet werden. Die übrigen Gruppen mit myokardialer Infarzierung zeigten im Trend ebenfalls eine, statistisch bei starker Streuung der Werte allerdings nicht signifikante, niedrigere Absolutkraft. β , $A\beta$, βA und P waren nicht voneinander verschieden, die zeitliche Abfolge der Medikamentengabe bei Kombinationsbehandelten Tieren erbrachte ebenfalls keine weitere Veränderung bezüglich F_{\max} .

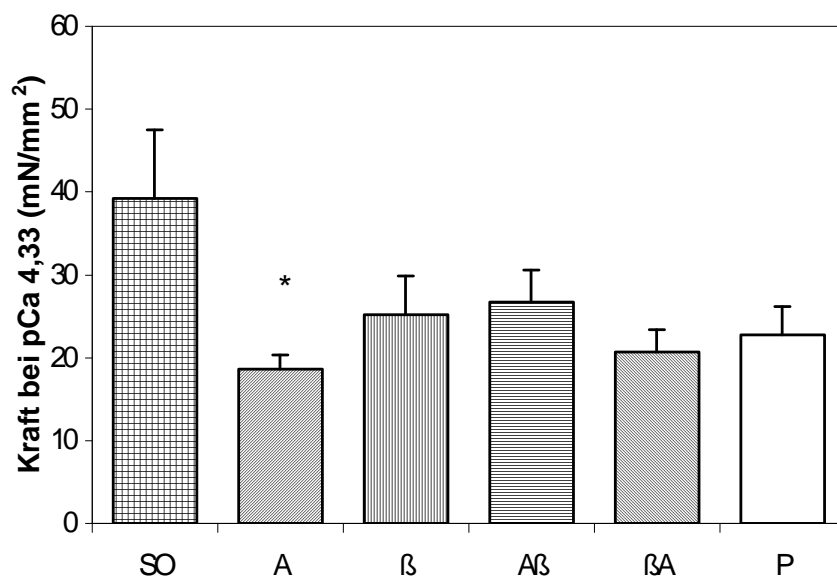


Abb 13: Maximal entwickelte Kraft (F_{\max}) des RV. *: $p < 0,05$ vs SO. Im Trend läßt sich dies auch für die Gruppen β , $A\beta$, βA und P nachvollziehen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

F. Präparate des Linken und Rechten Ventrikel im Vergleich

1. Reaktive myokardiale Hypertrophie

In beiden Ventrikeln infarzierter Herzen sahen wir eine signifikante myokardiale Hypertrophie im Vergleich zu nicht infarzierten, sham operierten Herzen.

Im Bereich des LV wiesen die Gruppen mit Kombinationsbehandlung ($A\beta$, βA) einen niedrigeren Hypertrophiegrad als die Gruppen mit alleiniger Behandlung mit dem

Betablocker (β) bzw. dem ACE-Hemmer (A) auf. Diese nur mit einem Präparat behandelten Tiere zeigten bzgl. ihres Hypertrophiegrades mit der Gruppe P vergleichbare Werte. Zwischen den Gruppen A und β sowie A β und β A bestand kein Unterschied.

Im Bereich des RV wiesen alle drei Gruppen mit einer erfolgten ACE-Hemmer-Behandlung (A, A β , β A) einen niedrigeren Hypertrophiegrad auf als die allein mit dem Betablocker behandelte Gruppe (β). Das relative Herzgewicht der Gruppe β kann auch im Bereich des RV mit der Gruppe P verglichen werden.

2. Die Ca^{2+} -Sensitivität

Im Vergleich der EC_{50} -Werte zwischen LV und RV zeigten sich für die Gruppen P, A, A β signifikant höhere EC_{50} -Werte des RV im Vergleich zum LV (P_{RV} : $5,19 \pm 0,03$ vs P_{LV} : $5,13 \pm 0,02$; A_{RV} : $5,21 \pm 0,03$ vs A_{LV} : $5,12 \pm 0,02$; $A\beta_{\text{RV}}$: $5,22 \pm 0,04$ vs $A\beta_{\text{LV}}$: $5,12 \pm 0,01$). Für die Gruppen β und β A ist kein Unterschied zwischen LV und RV zu verzeichnen (β_{RV} : $5,18 \pm 0,03$ vs β_{LV} : $5,16 \pm 0,01$; βA_{RV} : $5,20 \pm 0,04$ vs βA_{LV} : $5,19 \pm 0,02$). Im Trend konnte für die Gruppe SO ebenfalls eine Linksverschiebung der Kraft-Calcium-Kurve für den RV gesehen werden, allerdings war diese nicht signifikant.

Obwohl wir im Bereich des LV für die Gruppen β und β A eine höhere Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente im Vergleich zu den Gruppen P und SO sahen, zeigte sich dies nicht für den RV.

Wir sahen einen signifikant erniedrigten HILL Koeffizienten der Gruppen A und A β im Vergleich zwischen LV und RV (A_{RV} : $4,3 \pm 0,5$ vs A_{LV} : $5,1 \pm 0,4$; $A\beta_{\text{RV}}$: $3,7 \pm 0,4$ vs $A\beta_{\text{LV}}$: $4,8 \pm 0,3$). Dies konnte für die Gruppen β und β A, sowie P und SO nicht bestätigt werden.

3. Die maximal produzierte Kraft

In allen Herzen produzieren Fasern des RV nicht signifikant weniger Kraft als Fasern des LV. Dieses Ergebnis war unabhängig von der gegebenen Medikation und unabhängig von einem Infarkt ereignis. In beiden Ventrikeln produzieren Fasern aus Herzen

mit chronischer myokardialer Infarzierung eine deutlich geringere maximal induzierte Kraft im Vergleich zu SO. Im Bereich des RV erreicht dieser Unterschied aufgrund der Streuung der Werte allerdings nur für die Gruppe A statistische Signifikanz.

G. Parameter von Tieren ohne myokardiale Infarzierung mit Ramipril-Behandlung für drei bzw. sechs Wochen (ACE 3 bzw. ACE 6) und deren Kontrollen (Kontrolle 3 bzw. 6)

In dieser Versuchsreihe werden Tiere ohne myokardiale Infarzierung nach drei bzw. sechs Wochen Behandlung mit dem ACE-Hemmer Ramipril untersucht. Es soll dargestellt werden, ob die Behandlung mit dem ACE-Hemmer bei kardial nicht vorgeschädigten Tieren ähnliche Effekte hervorruft wie dies bei Tieren mit chronischer myokardialer Infarzierung der Fall ist.

Die grundlegenden Parameter dieser Versuchsreihe sind in Tabelle 4 dargestellt.

Parameter	Kontrolle 3	ACE 3	ACE 6	Kontrolle 6
Anzahl der Tiere (n)	13	9	10	13
Körpergew. (KG) (g)	342.5±4.9	411.4±6.6 •	438.2±13.9 •	511.2±13.6 • ;
LV/ KG (mg/g)	2.35±0.05	2.04±0.05 *	2.05±0.06 *	2.02±0.04 *
RV/ KG (mg/g)	0.72±0.03 ▪	0.66±0.02	0.52±0.02 =	0.61±0.02

Tab 4: Grundlegende Parameter von Tieren mit ACE-Inhibitor Behandlung ohne myokardiale Infarzierung. •: p<0.05 vs Kontrolle 3; ;: p<0.05 vs ACE 3, ACE 6; *: p<0.05 vs Kontrolle 3; =: p<0.05 vs ACE 3, Kontrolle 3, Kontrolle 6; ▪: p<0.05 vs ACE 6.

1. Körpergewicht und reaktive myokardiale Hypertrophie

Es zeigte sich in der 3 Wochen mit dem ACE-Hemmer behandelten Gruppe ACE 3 ein deutlich erhöhtes KG im Vergleich zu der altersgepaarten Kontrollgruppe (Kontrolle 3). Das KG der Gruppe ACE 6 war von dem der Gruppe ACE 3 nicht signifikant verschieden. Im Gegensatz zu dem gesehenen Anstieg des KG in der Gruppe ACE 3 im Vergleich zu Gruppe Kontrolle 3 wies die Gruppe ACE 6 im Vergleich zu ihrer altersgepaarten Kontrollgruppe ein signifikant niedrigeres KG auf. Die Wachstumskurve der Tiere mit erfolgter ACE-Hemmer-Behandlung flacht damit im Verlauf ab.

Dieser Sachverhalt wird in Abbildung 14 bildlich dargestellt.

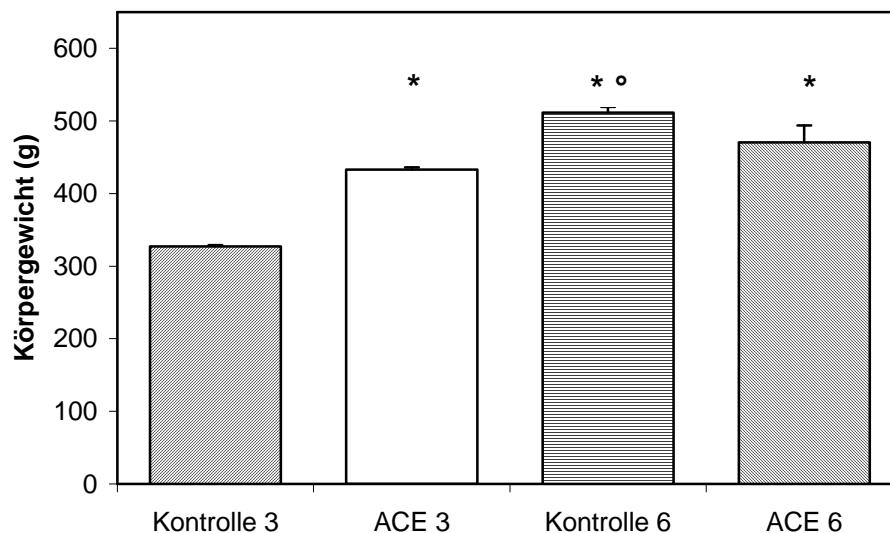


Abb 14: KG (in g) von Tieren ohne Infarkt mit ACE-Hemmer-Behandlg. für 3 bzw. 6 Wochen.

*: $p < 0,05$ vs Kontrolle 3;
 °: $p < 0,05$ vs ACE 3, ACE 6.

Werte dargestellt als Mittelwerte \pm SEM.

$n_{ACE\ 3} = 9$; $n_{Kontrolle\ 3} = 13$; $n_{ACE\ 6} = 13$; $n_{Kontr.6} = 10$.

In ACE 3 sahen wir eine Abnahme des linksventrikulären Gewichtes bezogen auf das KG im Vergleich zu Kontrolle 3. Auch die Gruppen Kontrolle 6 und ACE 6 zeigten ein geringeres relatives linksventrikuläres Gewicht als die Gruppe Kontrolle 3. Die Gruppen ACE 3, Kontrolle 6 und ACE 6 zeigten sich voneinander diesbezüglich nicht verschieden (dargestellt in Abbildung 15a).

Im Bereich des RV wies ACE 6 eine im Vergleich zu den anderen Gruppen signifikant erniedrigte RV/KG Ratio auf. Im Trend zeigte sich diese Erniedrigung auch für ACE 3 und Kontrolle 6 (Abbildung 15b). In beiden Ventrikeln ist das relative Herzgewicht der Tiere nach 6 Wochen (ACE 6 und Kontrolle 6) stets geringer als das relative Herzgewicht der dreiwöchigen Kontrollgruppe (Kontrolle 3). Das Herz wächst also nicht gleichermaßen mit dem KG mit.

Parameter	Kontrolle 3	ACE 3	ACE 6	Kontrolle 6
SL (μm)	1.83 \pm 0.03	1.84 \pm 0.03	1.85 \pm 0.03	1.84 \pm 0.02
F_{max} (mN/mm²)	40.5 \pm 4.0	26.6 \pm 4.5	25.5 \pm 2.4	36.5 \pm 2.3
EC₅₀	5.4 \pm 0.03	5.23 \pm 0.04 •	5.19 \pm 0.02 •	5.5 \pm 0.02
HILL	3.3 \pm 0.3 *	3.3 \pm 0.5 *	5.2 \pm 0.8	2.9 \pm 0.3 *

Tab 5: Parameter der Kraft-Ca²⁺-Beziehung von gehäuteten Fasern des LV von Tieren mit ACE-Inhibitor Behandlung und ohne myokardiale Infarzierung. •: p<0.01 vs Kontrolle 3, Kontrolle 6; *: p<0.05 vs ACE 6.

Parameter	Kontrolle 3	ACE 3	ACE 6	Kontrolle 6
SL (μm)	1.84 \pm 0.02	1.84 \pm 0.03	1.85 \pm 0.03	1.85 \pm 0.02
F_{max} (mN/mm²)	17.2 \pm 1.5 •	15.4 \pm 0.5 •	15.5 \pm 1.5 •	13.5 \pm 1.6 •
EC₅₀	5.23 \pm 0.04 *	5.27 \pm 0.04 *	5.27 \pm 0.03 *	5.52 \pm 0.02
HILL	6.1 \pm 1.5 *	3.5 \pm 0.8	3.4 \pm 0.9	2.7 \pm 0.3

Tab 6: Parameter der Kraft-Ca²⁺-Beziehung von gehäuteten Fasern des RV von Tieren mit ACE-Inhibitor Behandlung und ohne myokardiale Infarzierung. •: p<0.05 vs entsprechender Gruppen des LV; *: p<0.05 vs Kontrolle 6.

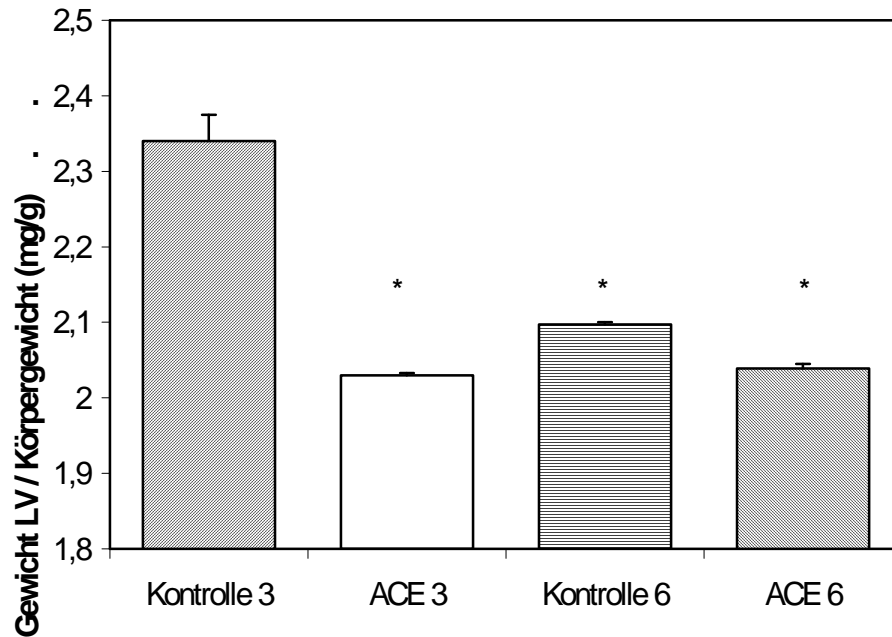


Abb 15a: Verhältnis von linksventrikulärem Gewicht zu KG (LV/ KG) in Tieren ohne myokardiale Infarzierung und mit Ramipril-Behandlung. $p < 0,05$ vs Kontrolle 3. Dargestellt als Mittelwerte \pm SEM. $n_{ACE\ 3} = 9$; $n_{Kontrolle\ 3} = 13$; $n_{ACE\ 6} = 13$; $n_{Kontrolle\ 6} = 10$.

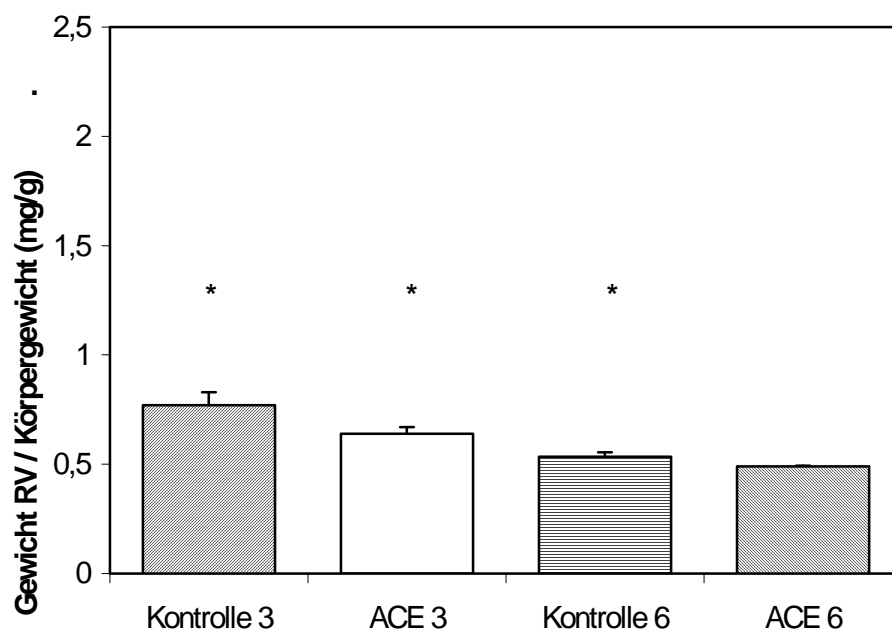


Abb 15b: Verhältnis von rechtsventrikulärem Gewicht zu KG (RV/KG) in Tieren ohne myokardiale Infarzierung und mit Ramipril-Behandlung. $p < 0,05$ vs Kontrolle 6. Dargestellt als Mittelwerte \pm SEM.

2. Kraft- Ca^{2+} -Beziehung

Im Bereich des LV sahen wir eine signifikant niedrigere Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente in beiden mit dem ACE-Hemmer behandelten Gruppen im Vergleich zu den altersentsprechenden Kontrollgruppen. Die Kontrollgruppen unterschieden sich diesbezüglich nicht voneinander. Der HILL Koeffizient der beiden Kontrollgruppen und

der drei Wochen mit dem ACE-Inhibitor behandelten Gruppe zeigten sich voneinander nicht verschieden. Signifikant erhöht war im Vergleich hierzu allerdings der HILL Koeffizient der Gruppe ACE 6 auf $5,2 \pm 0,8$. Dies wird durch die produzierte Kraft bei submaximalem Calcium deutlich (bei pCa 5.22: $73,9\% \pm 3,6$ in Kontrolle 3, $81,8\% \pm 3,0$ in Kontrolle 6, $50,2\% \pm 6,4$ in ACE 3 und $33,8\% \pm 4,9$ in ACE 6). Die Abbildung 16 stellt diesen Sachverhalt bildlich dar.

Für den RV konnte eine signifikant höhere Ca^{2+} -Sensitivität lediglich in der Gruppe Kontrolle 6 verzeichnet werden (nicht dargestellt). Ein Unterschied zwischen den Gruppen ACE 3, Kontrolle 3 und ACE 6 bestand nicht. Bezüglich des HILL Koeffizienten zeigte sich, im Gegensatz zum LV, nur ein Unterschied zwischen den Gruppen Kontrolle 3 und 6.

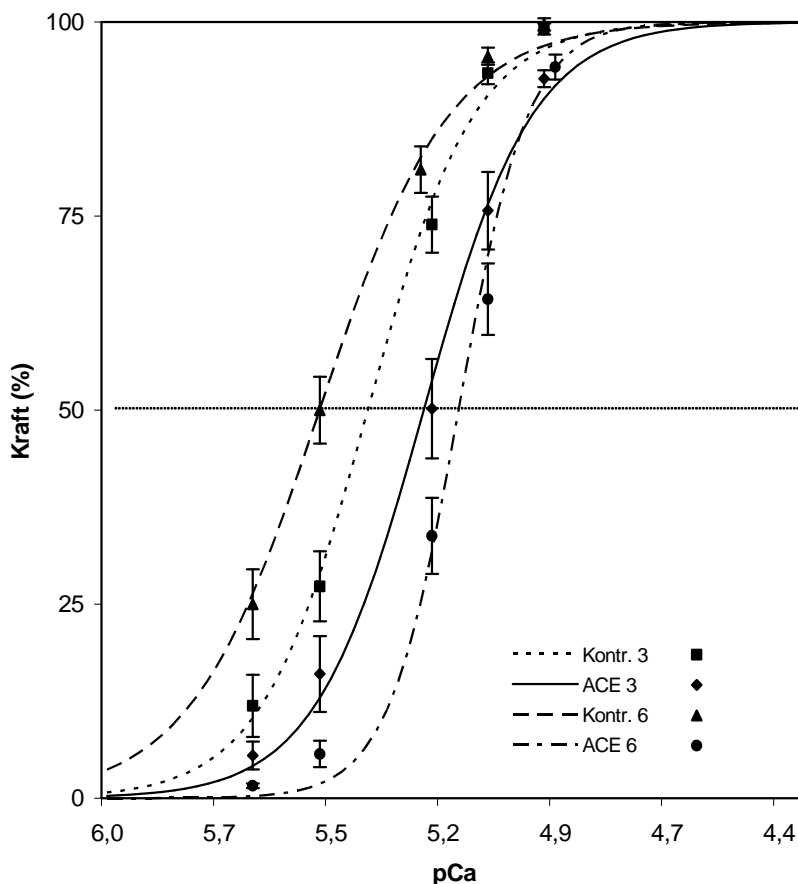


Abb 16: Kraft- Ca^{2+} -Beziehung des LV von Gruppen ohne MI mit ACE-Hemmer-Behandlung. Signifikant niedrigere EC_{50} -Werte in ACE3 und ACE6 vs Kontrolle 3 und 6; $p < 0,01$.

Erhöhung des HILL Koeffizienten in ACE6 vs ACE3, Kontrolle 3 und 6; $p < 0,05$.

3. Die maximal produzierte Kraft

Es konnte ein Abfall von F_{max} im Bereich des LV in Abhängigkeit von der ACE-Behandlung festgestellt werden. Die Gruppen ACE 3 und ACE 6 produzierten

signifikant weniger Kraft als die altersentsprechenden Kontrollgruppen. Es wurde ebenfalls ein leichter Abfall von F_{\max} mit zunehmendem Alter im Vergleich der beiden Kontrollgruppen (Kontrolle 3 und 6) und der Ramipril behandelten Gruppen (ACE 3, ACE 6) miteinander gesehen. Dies war jedoch nicht statistisch signifikant.

Der RV produziert, ganz im Gegensatz zu der vorgeschalteten Versuchsreihe unter Einbeziehung von Herzen mit myokardialer Infarzierung, in allen Gruppen signifikant weniger Kraft als der LV. Ein Unterschied in Abhängigkeit von der ACE-Inhibitor Behandlung konnte nicht gesehen werden.

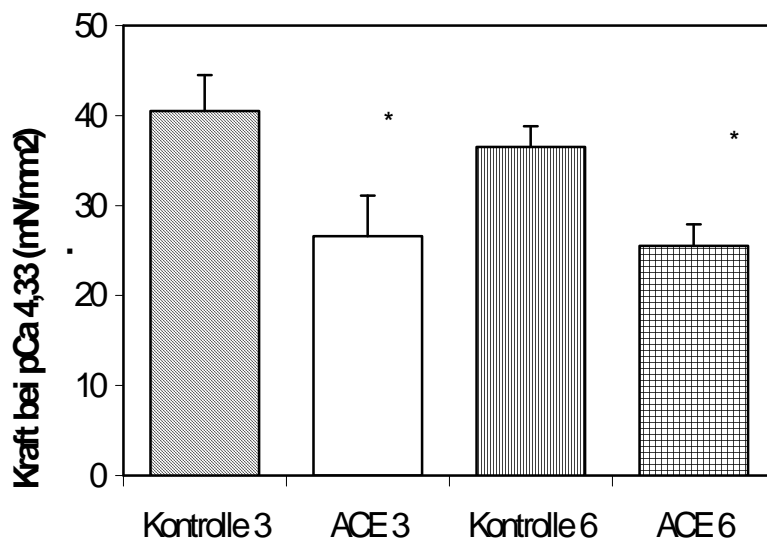


Abb 17a: Maximal entwickelte Kraft (F_{\max}) des LV von Herzen ohne myokardiale Infarzierung mit ACE-Hemmer Behandlung.

*: $p < 0,05$ vs Kontrolle 3 und 6.

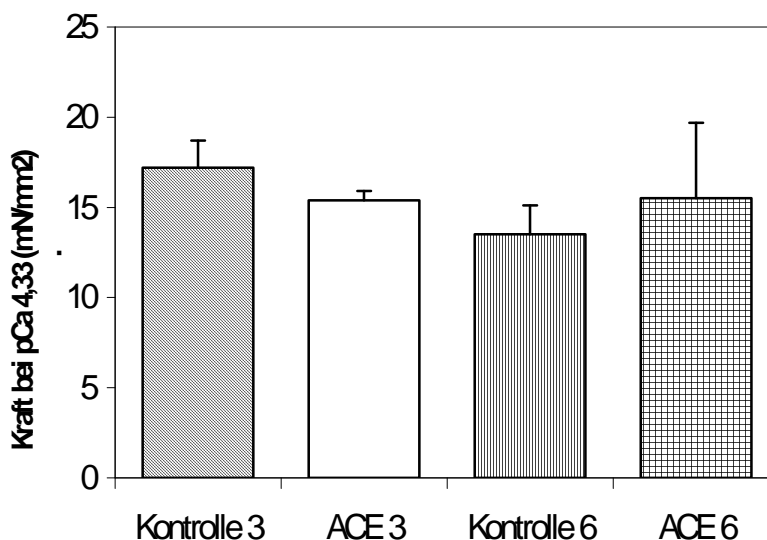


Abb 17b: F_{\max} des RV von Herzen ohne myokardiale Infarzierung mit ACE-Hemmer Behandlung.

Im gegenseitigen Vergleich besteht kein signifikanter Unterschied.

H. Ergebnisse der Gelelektrophoresen

Die Phosphorylierung der MLC bewirkt vermutlich eine Zunahme der Kontraktionskraft auf dem Boden einer Erhöhung der Ca^{2+} -Sensitivität. Unter pathophysiologischen Bedingungen könnte der Phosphorylierung der MLC eine wichtige Rolle zukommen. Der Grad der Phosphorylierung der leichten Ketten des Myosins wurde in dieser Arbeit anhand der gefärbten Gele mit einem Durchlichtdensitometer ausgewertet. Es zeigte sich dabei kein signifikanter Unterschied im Phosphorylierungsgrad zwischen den einzelnen Gruppen. Mit einer durchschnittlichen Phosphorylierung von ~3% lag der Wert weit unter dem in Rattenherzen erwarteten Wert einer basalen Phosphorylierung von ~30-40%. Es muss daher von einer Dephosphorylierung der leichten Ketten des Myosins ausgegangen werden. Wahrscheinlich fand dieser Vorgang während der Präparierung der Fasern und der weiteren Verarbeitung statt.

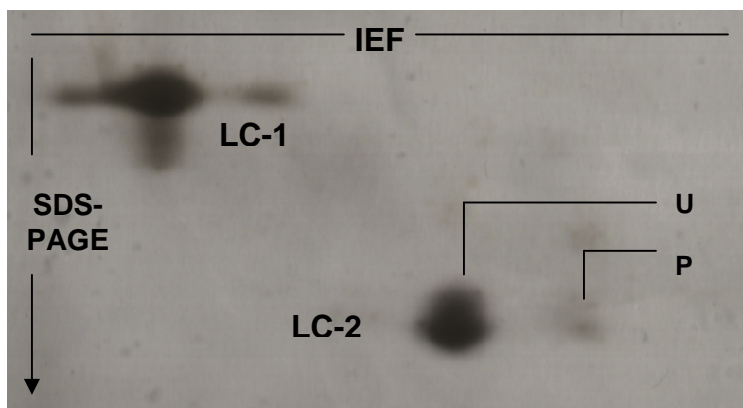


Abb.18a: Zwei-dimensionale Gelelektrophorese der MLC in gehäuteten trabekulären Fasern des linken Ventrikels. LC-1 = ess. leichte Ketten d. Myosins, LC-2 = regulatorische leichte Ketten des Myosins, U = unphosphoryl. Form, P = phosphoryl. Form.

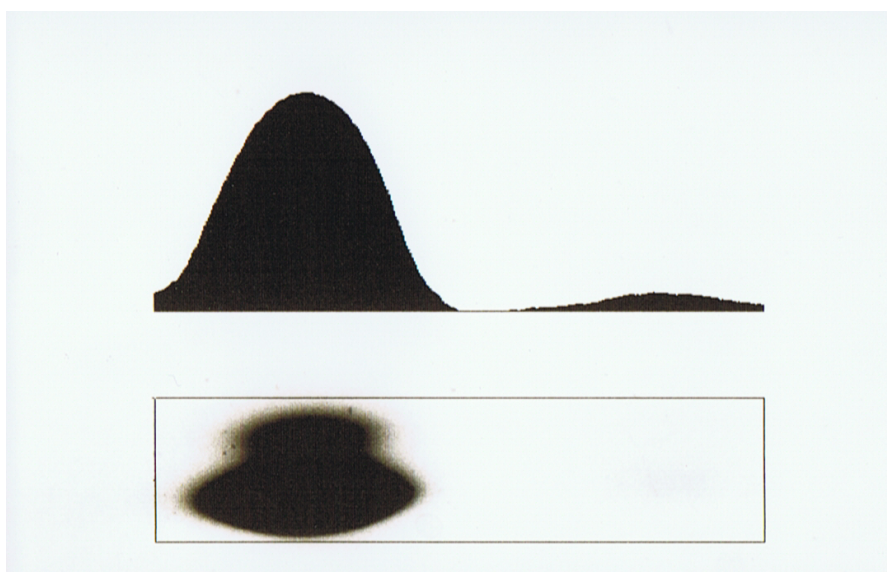


Abb. 18b: Durchlichtdensitometrische Analyse gefärbter Gelelektrophoresen der MLC Phosphorylierung gehäuteter Fasern des linken Ventrikels. Die durchschnittliche Phosphorylierung lag mit ~3% weit unter dem erwarteten Wert.

Die Abbildungen 18a und 18b zeigen eine representative Gelelektrophorese der Myosin-Leichtketten von gehäuteten trabekulären Fasern des linken Ventrikels sowie deren durchlichtdensitometrischer Scan.

IV. Diskussion

In Herzen mit myokardialer Infarzierung kommt es im Verlauf zu verschiedenen pathomorphologischen Veränderungen und Anpassungsvorgängen, welche als ventrikuläres Remodeling bezeichnet werden.

Eine Vielzahl adaptativer Veränderungen konnte in diesem Prozess identifiziert werden. Das Remodeling nach Myokardinfarkt beinhaltet u.a. die Entwicklung kardialer Hypertrophie (*Zimmer et al., 1990; Pfeffer et al., 1992*), linksventrikuläre Dilatation und verschiedene biochemische und molekulare Veränderungen, die die kontraktile Funktion des Herzens beeinflussen (*Pfeffer et al., 1990*). Unterschiedliche Mechanismen tragen hierzu bei, so z. B. die Übertragung von Signalen, die zur Stimulierung von Wachstumsprozessen in der Zelle und dem damit verbundenen strukturellen Umbau führen. Ein zentraler Vorgang beim ventrikulären Remodeling ist die Hypertrophie der Herzmuskelzellen, bei der sich die Zellen sowohl in der Länge als auch im Durchmesser vergrößern (s.o.). Je nach Ausmaß der Schädigung nimmt die globale Kontraktilität und Funktion des linken Ventrikels im Verlauf unterschiedlich stark ab. Über Veränderungen des Calcium-Handlings und deren Auswirkungen auf die kontraktile Funktion, insbesondere unter dem Einfluß verschiedener herzwirksamer Medikamente, ist derzeit noch wenig bekannt.

Parallel zu den genannten Wachstumsprozessen ist in infarzierten Herzen oft eine Erniedrigung der Ca^{2+} -Sensitivität von Fasern aus nicht-infarzierten Arealen des linken oder auch des rechten Ventrikels im Vergleich zu Fasern aus Herzen ohne myokardiale Infarzierung zu verzeichnen (*Hajjar et al., 1990; Li et al., 1997*). Diesbezüglich gibt es in der Literatur eine Vielzahl, sich teilweise widersprechender Angaben. Der genaue Mechanismus der veränderten Kontraktilität und Ca^{2+} -Sensitivität einzelner Kardiomyozyten nach myokardialer Infarzierung ist bis heute nicht vollständig verstanden.

Es ergab sich für uns die Frage, inwieweit die Ca^{2+} -Sensitivität von Muskelfasern nicht-infarzierter Areale aus Herzen mit chronischer myokardialer Infarzierung verändert ist und inwieweit sich die Prozesse, die die Ca^{2+} -Sensitivität unter den pathologischen Bedingungen einer myokardialen Infarzierung beeinflussen, möglicherweise durch die Gabe bestimmter Medikamente verändern lassen.

Dieser Fragestellung wurde in der vorliegenden Arbeit unter Verwendung des ACE-Hemmers Ramipril und des Betablockers Metoprolol nachgegangen.

Zur Beurteilung der Ca^{2+} -Sensitivität von Myozyten wählten wir ein Modell mit Triton-X-100 gehäuteten Trabekelfasern aus nicht-infarzierten Arealen von Rattenherzen 6 Wochen nach durchgemachtem Myokardinfarkt. Durch die chemische Entfernung der Membranen der Herzmuskelzelle kann ein direkter Zugang zu dem kontraktilem Apparat geschaffen und so dessen Beeinflussung ermöglicht werden.

Tiermodelle sind zur Untersuchung von physiologischen und pathologischen Veränderungen geeignet, welche im Rahmen verschiedenster Erkrankungen auftreten können. Das Tiermodell bietet durch eine gewisse „Homogenität“ der verwendeten Versuchstiere (Alter, Gewicht, Rasse etc.) eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Zudem verbieten ethisch-moralische Gründe in aller Regel, solche Studien am Menschen durchzuführen.

Die Labormaus ist das kreislaufphysiologisch am besten charakterisierte Versuchstier. Sie wird sehr häufig als Modell für die Untersuchung der pathophysiologischen Verhältnisse nach Myokardinfarkt verwendet (*Zimmer et al., 1990; Litwin et al., 1992; Dhalla et al., 1992*).

1. Einfluß des Infarktes auf das Körpergewicht und die myokardiale Hypertrophie

Nach akutem Myokardinfarkt kommt es zu einer veränderten systolischen und diastolischen Funktion des verbliebenen vitalen Myokards mit einer Erhöhung des linksventrikulären enddiastolischen Druckes (*Pfeffer JM, 1991*). Durch diese hämodynamischen Einflüsse werden reaktive Wachstumsprozesse eingeleitet. Es kommt zu einer Myokardhypertrophie, welche in erster Linie durch Hypertrophie der

einzelnen Myozyten bedingt ist, aber auch eine Vermehrung der interstitiellen kollagenen Matrix einschließt. Bei ausgedehnter myokardialer Infarzierung kann sich das Volumen der überlebenden Myozyten im Rahmen der Hypertrophieentwicklung nahezu verdoppeln (*Zimmer et al., 1990*).

Dabei gelten die Größe des infarzierten Gewebes und damit der Verlust funktionellen Myokards als wesentlicher Einflußfaktor für die Entwicklung der Hypertrophie eines Herzens. Untersuchungen haben ergeben, dass es bei Infarktarealen um 20% zu einer gering ausgeprägten Hypertrophie kommt (*Rubin et al., 1983*). Mit zunehmender Infarktgröße nimmt auch das Ausmaß der Hypertrophie zu. Die Hypertrophie erfaßt nicht nur das überlebende Gewebe des linken Ventrikel, sondern in ähnlicher Weise auch die rechte Herzkammer (*Marmor et al., 1981; Schieffer et al., 1987*).

Zunächst kann die Myokardhypertrophie als eine Art Adaptationsversuch verstanden werden, denn sie ermöglicht bei Myokardüberdehnung eine Reduktion der Wandspannung durch Zunahme des Myokardquerschnittes. Im weiteren Verlauf kommt es trotz Zunahme der myokardialen Muskelmasse zu einer Zunahme der kardialen Funktionsstörung (*Pfeffer et al., 1990*). Hierzu tragen die Vermehrung des kardialen Bindegewebes mit der Folge einer verminderten diastolischen Kammerdehnbarkeit sowie eine Minderung der Koronarreserve bei. Auch Veränderungen der transmembranären Signalübertragung (*Dhalla et al., 1992*), die Annäherung der kontraktilen Proteine an den fetalen Phänotyp sowie eine verminderte Expression der Ca^{2+} -ATPase des SR (*Yamaguchi et al., 1997; Brittsan & Kranias, 2000*) werden weiterhin diskutiert.

Neben den erwähnten mechanischen Auslösemechanismen durch vermehrte Druck- und Volumenbelastung des LV wird eine zusätzliche Modulation der Hypertrophie durch direkte trophische Wirkung des aktivierten neuroendokrinen Systems angenommen. So konnten Veränderungen in der systemischen und lokalen Bildung von Ang II nach myokardialer Infarzierung bei *Pfeffer et al. (1990)* beobachtet werden. Das vermehrt gebildete Ang II führt über den AT_1 -Rezeptor zu einer Hypertrophie der Kardiomyozyten und stimuliert zudem die Kollagensynthese der kardialen Fibroblasten (*Sadoshima et al., 1993; Brilla et al., 1994*). In der Zellkultur ist Ang II in der Lage, eine Hypertrophie von Kardiomyozyten hervorzurufen (*Yamazaki et al., 1997*).

Das ACE führt ebenfalls zu einem Abbau von Bradykinin im Plasma und Gewebe. Unter medikamentöser Inhibition des ACE kommt es folglich zu einem Anstieg der

Konzentration des Bradykinin (*Campbell et al., 1994; Stauss et al., 1994*) und zu einer verminderten interstitieller Anhäufung von Kollagen (*Wollert et al., 1997*). Die Hypertrophie der Kardiomyozyten selbst wird durch die Erhöhung dieser endogenen Kinine nicht beeinflusst. Eine verminderte Hypertrophie der Kardiomyozyten unter Inhibition des ACE ist vielmehr das Ergebnis der konsekutiv verminderten Bildung des Angiotensin II.

Die myokardiale Hypertrophie gilt als ein wichtiger Risikofaktor für eine Verschlechterung der kardialen Pumpfunktion (*Pfeffer et al., 1990*) sowie für eine erhöhte kardiovaskuläre Mortalität (*Levy et al., 1990*).

Ein Maß für die entstandene Hypertrophie ist das relative links- bzw. rechtsventrikuläre Herzgewicht, dargestellt durch die LV/KG Ratio und die RV/KG Ratio.

In der vorliegenden Studie war das Körpergewicht (KG) in allen Gruppen mit Infarkt im Vergleich zur sham operierten Gruppe signifikant niedriger.

Hierbei wiesen die mit dem Betablocker behandelten Tiere, unabhängig von der Gabe als Monotherapie oder Kombinationstherapie, das signifikant niedrigste KG auf. Die Behandlung mit dem ACE-Hemmer erbrachte bei den Tieren einen größeren Zuwachs des KG im Vergleich zu den mit dem Betablocker behandelten Tieren. Es scheint, dass eine myokardiale Infarzierung auf die gesamte körperliche Entwicklung der Tiere Einfluß nimmt.

Inwieweit der einfache Parameter KG uns Aufschluß geben kann über ein gesundes Gedeihen der Tiere kann hier nicht näher geklärt werden, da viele Faktoren das Körpergewicht beeinflussen. Dazu gehören z. B. auch die Zeichen einer kardialen Dekompensation wie Ödeme, Pleura- oder Perikardergüsse, pulmonale und viszerale Stauung, welche zwar das KG deutlich erhöhen können, ein gesundes Gedeihen aber ausschliessen. Inwieweit dies für die einzelnen Gruppen zutrifft, muß in zukünftigen Studien, die klinische Parameter wie z.B. Lungen- und Lebergewicht als Hinweise für eine Links- oder Rechtsherzinsuffizienz miteinbeziehen, geklärt werden.

In der vorliegenden Studie zeigte sich, unabhängig von einer medikamentösen Behandlung, ein erhöhtes Verhältnis von linksventrikulärem Gewicht zu Gesamtkörpergewicht (LV/KG) in Herzen mit myokardialer Infarzierung im Vergleich zu sham operierten Herzen. Eine signifikant geringere Ausbildung der Hypertrophie konnte

nur in der kombinationsbehandelten Gruppe A β im Vergleich zu A, β oder P beobachtet werden. Es muss kritisch angemerkt werden, dass der Parameter Körpergewicht maßgeblich in die Berechnung des relativen Ventrikelgewichtes und damit in die Berechnung des Hypertrophiegrades eingeht, und dass ein erhöhtes KG, sei es auf dem Boden eines gesunden Wachstums oder einer Gewichtszunahme aufgrund kardialer Dekompensation, rechnerisch ein niedrigeres relatives Herzgewicht impliziert. Weitere Studien müssen den Sachverhalt unter Berücksichtigung dieser Problematik untersuchen.

In dem vorliegenden Modell konnten wir den Befund von *Schieffer et al. (1987)* nicht bestätigen, die in chronisch infarzierten Herzen unter Monotherapie mit dem ACE-Inhibitor Enalapril eine verminderte Ausbildung der linksventrikulären Hypertrophie im Vergleich zu Placebo behandelten Tieren fanden.

Rechtsventrikulär bestand ebenfalls eine signifikante Herzmuskelhypertrophie von Herzen aller Gruppen mit myokardialer Infarzierung im Vergleich zu der sham operierten Gruppe. Die Behandlung mit dem ACE-Hemmstoff, sowohl als Mono- oder auch als Kombinationstherapie, erbrachte hier eine deutliche Verringerung der rechtsventrikulären Hypertrophie im Vergleich zu der Placebo behandelten Gruppe und der alleinig mit dem Betablocker behandelten Gruppe. Dies bestätigt das Ergebnis von *Schieffer et al.*, die zeigten, dass sich unter der Therapie mit einem ACE-Hemmer das rechtsventrikuläre Kammergewicht nicht signifikant von dem der sham operierten Tiere unterscheidet.

Bedenkt man, dass ein Großteil (bis 55% bei *Schieffer et al.* im Gegensatz zu den bei uns verzeichneten 36-43%) des linksventrikulären Gewebes durch Narbengewebe ersetzt worden ist, so erscheint eine durch die Gabe des ACE-Inhibitors gesteuerte, vollständige Unterdrückung der Hypertrophieentwicklung im Bereich des LV eher unwahrscheinlich.

Warum der RV bei medikamentöser Behandlung mit dem ACE-Inhibitor mit einer größeren Verringerung der Hypertrophie reagiert als der LV, bleibt letztendlich noch ungeklärt.

Methodenkritisch muss hier angemerkt werden, dass z. B. besonders ungünstige hämodynamische Verhältnisse im Bereich des großen Kreislaufs den antihypertrophen Eigenschaften der eingesetzten ACE-Hemmer im Bereich des LV in unserer Studie entgegen gewirkt haben könnten. Entsprechende Untersuchungen sollten in künftigen

Arbeiten am Infarktmodell berücksichtigt werden. Die beobachtete verringerte Ausbildung einer linksventrikulären Myokardhypertrophie unter Kombinationsbehandlung mit einem Betablocker und einem ACE-Inhibitor könnte z.B. für die Möglichkeit verbesserter hämodynamischer Bedingungen im Bereich des großen Kreislaufs unter einer zusätzlichen β -Blockade sprechen.

Bei alleiniger Gabe des Betablockers konnte ein antihypertropher Effekt, den wir bei einer Kombinationsbehandlung gesehen haben, nicht beobachtet werden. Im Vergleich zur sham operierten Gruppe waren sich beide Ventrikel unter β -Blockade signifikant hypertrophiert.

2. Methodenkritische Beurteilung des Modells gehäuteter Herzmuskelfasern

Untersuchungen des kontraktiven Verhaltens von Muskelfasern können sowohl an intakten als auch an gehäuteten Herzmuskelfasern erfolgen. Soll die Beziehung zwischen freiem Calcium und der produzierten Kraft untersucht werden, so hat sich das gehäutete Modell als Standardmethode bewährt (z.B. *Ruegg und Morano 1989*). Das Häutungsverfahren kann hierbei mechanisch oder auch chemisch erfolgen. Durch das Entfernen der Membranen der Zelle wird ein direkter Zugang zu dem kontraktiven Apparat der Muskelzelle möglich und das innere Milieu der Zelle kann durch die verschiedenen Kontraktions- bzw. Relaxationslösungen von außen kontrolliert werden. Die direkte Messung der Kraft- Ca^{2+} -Relation ist damit möglich geworden.

Trotz dieser Vorteile wird das Häutungsverfahren jedoch durch verschiedene Umstände begrenzt, die in der Ergebnisdiskussion der hier vorliegenden Arbeit berücksichtigt werden müssen.

Die Häutung kann mit dem Verlust wichtiger Strukturen oder Regulatorproteine des kontraktiven Apparates einhergehen. Durch das Entfernen der physikalischen Barriere zwischen Zytoplasma und externer Lösung, kommt es zum Verlust dieser Substanzen aus dem Zytoplasma. Dazu gehören z. B. Carnosin und Taurin, die als natürliche Ca^{2+} -Sensitizer in der Zelle gelten (*Steele et al., 1990*). Es resultiert eine verminderte Calcium-Sensitivität (*Gao et al., 1994*).

Die Zusammensetzung der Kontraktions- und Relaxationslösung sollte das intrazelluläre Ionenmilieu möglichst exakt nachahmen. Allerdings ist die intrazelluläre Konzentration vieler Ionen in vivo nicht genau bekannt. Da die Myofilamente sehr

empfindlich auf Änderungen von pH Wert, $[Mg^{2+}]$ und $[MgATP]$ reagieren, haben bereits kleinste Konzentrationsänderungen Auswirkungen auf den Verlauf der Kraft- Ca^{2+} -Beziehung der Myofilamente. Verunreinigungen der Versuchslösungen mit Ionen können damit bereits die Calcium-Sensitivität beeinflussen (*Hertzog et al., 1982; Solaro et al., 1989*). Damit wird es schwierig, diese wichtigen Regulatoren der Kraft- Ca^{2+} -Beziehung möglichst genau vorzugeben (*Fabiato et al., 1975; Kentish et al., 1986*).

Des Weiteren sollte auch der Präpariervorgang der Muskelpräparate betrachtet werden. Da sich die Kraftentwicklung proportional zum Querschnitt der Muskelfasern verhält, ist auf eine einheitliche Faserdicke zu achten. Ein möglichst geringer Durchmesser ist außerdem wichtig für die ausreichende Diffusion von z.B. ATP, welches durch die Versuchslösungen bereitgestellt wird.

Bei direktem Vergleich zwischen intakten und gehäuteten Faserpräparaten findet sich bei den gehäuteten eine Abnahme der Ca^{2+} -Sensitivität, dargestellt durch eine nach rechts verschobene Kraft- Ca^{2+} -Kurve, welche außerdem weniger steil verläuft. Die Hill Koeffizienten liegen bei etwa 2-3 im Vergleich zu 5-6 bei intakten Präparaten (*Gao et al., 1994*). Dies bedeutet eine verminderte Ca^{2+} -Sensitivität im Vergleich zu ungehäuteten Fasern.

Der Effekt der Desensitivierung durch Häutung wurde durch andere Autoren ebenfalls bestätigt (*Hajjar et al., 1990*). In der hier vorliegenden Studie verwendeten wir ausschließlich gehäutete Fasern, so dass bei einem Vergleich zwischen den Gruppen dieser Effekt ausgeschlossen werden konnte. Dennoch sollte bedacht werden, dass aus oben genannten Gründen in Versuchsmodellen mit gehäuteten Muskelfasern Ergebnisse erzielt werden, die die Ergebnisse physiologisch intakter Muskelpräparationen nicht exakt abzubilden vermögen.

Es sind heute verschiedene Permeabilisierungsverfahren verfügbar. In dieser Arbeit wurde ein chemisches Häutungsverfahren mit Triton-X-100 gewählt. Nach der Häutung liegen die Myofilamente funktionell isoliert vor. Es können so Mechanismen untersucht werden, die mit der Interaktion der kontraktilen Proteine zu tun haben oder auf diese Einfluß nehmen. Zytosolische Prozesse, die sich z.B. im Gefolge einer chronischen myokardialen Infarzierung ergeben, sind bei dieser Methode nicht mehr wirksam.

3. Ca^{2+} -Sensitivität und HILL Koeffizient von Myozyten des LV nach myokardialer Infarzierung

In Tiermodellen konnte bewiesen werden, dass die intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase in Herzen mit chronischer myokardialer Infarzierung stark verändert ist. Diese veränderte Ca^{2+} -Homöostase wird allgemein als ein entscheidender Faktor für die Pathophysiologie des Herzversagens angesehen. Von Bedeutung ist dabei vor allem die verminderte Ca^{2+} -Aufnahme in das SR und die damit verbundene geringere Ca^{2+} -Freisetzung während der nächsten Systole. In verschiedenen Studien des Herzversagens sahen wir als Grund hierfür eine verringerte Konzentration der Ca^{2+} -ATPase des SR auf dem Boden einer verminderten Gen-Expression (*Zarain-Herzberg et al., 1996; Mac Lennon et al., 1997*). Auch die Expression des sarkolemmlen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers scheint quantitativ verändert (*Quinn et al., 2003*).

Welche Rolle Veränderungen der Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente spielen, ist bis heute nicht abschliessend untersucht worden.

Bereits *Fellenius et al. (1985)* konnten nachweisen, dass sich in intakten Herzen 1 bzw. 3 Wochen nach myokardialer Infarzierung durch Ligatur der linken Koronararterie ein signifikant geringerer systolischer Druck erzeugen ließ als bei sham operierten Tieren. Bei Untersuchung des maximal produzierten systolischen Druckes in Abhängigkeit von der Erhöhung des extrazellulären Ca^{2+} zeigte sich, dass bereits kurz nach Infarzierung eine verringerte Ca^{2+} -Sensitivität auftrat. *Fellenius* schlußfolgerte daraus, dass hypertrophiertes Herzmuskelgewebe infarzierter Herzen stärker auf einen Abfall des extrazellulären Ca^{2+} reagiert, als dies bei nicht infarzierten Herzen der Fall ist. Er konnte außerdem beobachten, dass die Ansprechbarkeit des Herzmuskelgewebes auf den Ca^{2+} -Kanalblocker Verapamil in infarzierten Herzen deutlich höher war als in den Kontrollgruppen. Auch dies könnte für eine veränderte Aktivität der Ca^{2+} -Kanäle in infarzierten Herzen sprechen.

Bei *Li et al. (1997)* sahen wir eine Woche nach myokardialer Infarzierung eine Verminderung der produzierten Kraft bei submaximalen Ca^{2+} -Konzentrationen. Die maximal produzierte Kraft war dabei zwischen den infarzierten und den sham operierten Tieren nicht signifikant verschieden. *Li* verwendete Triton-gehäutete einzelne Myozyten aus nicht-infarzierten Arealen des LV.

Die hier vorliegende Arbeit belegt, dass die Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente von Ratten 6 Wochen nach myokardialer Infarzierung durch Ligatur der linken Koronararterie zwischen Placebo behandelten und sham operierten Tieren nicht signifikant verschieden ist. Dies gilt für beide Ventrikel. Der HILL Koeffizient von Tieren der Placebo Gruppe hingegen war im Vergleich zu der sham operierten Gruppe deutlich erniedrigt.

Der von uns gefundene Unterschied im Vergleich zu der Studie von *Fellenius* kann möglicherweise durch die Verwendung unterschiedlicher Versuchsmodelle und die längere Zeit, die nach Infarkt verstrichen ist, erklärt werden. Da *Fellenius* intakte, nicht gehäutete Präparate verwendete, ist ein Vergleich mit der von uns festgestellten unveränderten Ca^{2+} -Sensitivität nach Infarkt nur schwer möglich. Änderungen der produzierten Kraft auf extrazelluläres Ca^{2+} sind in Modellen mit intakten Membranen sehr komplex. Das von uns verwendete Tiermodell mißt den Effekt von Calcium direkt auf die Myofilamente unter Elimination von Membranvorgängen. *Li* verwendete in seiner Arbeit ein Tiermodell mit Triton-gehäuteten Myozyten aus nicht-infarzierten Arealen des LV, eine Woche nach myokardialer Infarzierung. Die von uns verwendeten Tiere wurden sechs Wochen nach Ligatur der linken Koronararterie untersucht. Veränderungen der Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente im zeitlichen Verlauf nach chronischer myokardialer Infarzierung sind also anzunehmen.

Ein weiterer Unterschied betraf die Steilheit der Kurven und damit den HILL Koeffizienten als Maß für die Kooperativität. In den placebo behandelten Gruppen stellten wir eine signifikante Erniedrigung des Hill Koeffizienten fest.

Mögliche Erklärungsansätze können z. B. in der unterschiedlichen Zusammensetzung der Troponin-Isoformen gesehen werden. Tauscht man, wie bei *Brenner (Brenner et al., 1999)* gesehen, in der Skelettmuskulatur das endogene Troponin mit kardialem Troponin aus, resultiert eine wesentlich steilere Kraft- Ca^{2+} -Beziehung. Zu diesem Thema arbeiteten *Huang et al. (1999)* mit genetisch veränderten Mäusen, bei denen das kardiale Tnl- (cTnl-) Gen in der Weise verändert wurde, dass es zu einer verminderten Expression von cTnl kam. Mit dem Heranwachsen und dem damit verbundenen Verlust der Expression der fetalen Troponin-Isoformen kam es bei fast allen Tieren zu einer schweren chronischen Herzinsuffizienz mit Todesfolge.

Weiterführende Arbeiten müssen nun untersuchen, ob und in welchem Maße sich die Isoformen des Troponin unter Infarktbedingungen ändern.

Ein weiterer auf die Ca^{2+} -Sensitivität einflußnehmender Faktor muß möglicherweise in verschiedenen Sarkomerlängen und damit in einer unterschiedlichen Vordehnung der Myofilamente in den verschiedenen Studien gesehen werden. Die von uns gemessenen Sarkomerlängen der verschiedenen Gruppen waren nicht signifikant unterschiedlich, so dass sie zumindest im Vergleich zwischen den Gruppen dieser Studie als einflußnehmende Quelle ausgeschlossen werden können.

Die von uns beschriebene unveränderte Ca^{2+} -Sensitivität entspricht dem Ergebnis der Studie von *Holt et al. (1998)*, in der die Mechanismen der Kardiomyozyten-Dysfunktion 6 Wochen nach Ligatur der linken Koronararterie an nicht permeabilisierten Fasern untersucht wurden. Auch hier konnte gezeigt werden, dass in Herzen mit einer myokardialen Infarzierung und insgesamt verminderter kontraktiler Funktion keine signifikante Veränderung der Ca^{2+} -Sensitivität vorlag. Im Trend war allerdings eine leichte, aber nicht signifikante Desensitivierung der Myozyten in Herzen mit chronischer Infarzierung zu erkennen. Die Sensitivität wurde bestimmt durch Messung der fura-2 Transienten zusammen mit der mechanischen Verkürzung der Myozyten. Den Grund hierfür sah *Holt* in verminderten Ca^{2+} -Transienten infarzierter Herzen. Er stellte die Vermutung auf, dass die reduzierte kontraktile Funktion der Myozyten in direkter Relation mit einer erniedrigten zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration während der Systole steht.

Ist die Ischämphase des Herzens relativ kurz, z. B. kleiner als eine Stunde, so wird der Metabolismus der myokardialen Zellen in der folgenden Reperfusionphase weitestgehend wiederhergestellt; der intrazelluläre pH, die Konzentration an anorganischem Phosphat und Creatinphosphat normalisieren sich dann innerhalb von Minuten nach Reperfusion (*Kusuoka et al., 1987, 1992*). Trotz dieser Wiederherstellung des Metabolismus bleibt das myokardiale Gewebe oft in einem Zustand deutlich herabgesetzter Funktion zurück und wird als sogenanntes „stunned myocardium“ bezeichnet. *Kusuoka et al. (1992)* konnten zeigen, dass die Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente auch in Fällen kurzzeitiger Hypoxie deutlich herabgesetzt war. Die produzierte Kraft lag um durchschnittlich 20% niedriger als in den Kontrollgruppen, während sich die Konzentration des intrazellulären Ca^{2+} verdoppelt hatte.

Gao et al. (1997) identifizierten eine Proteolyse des kardialen Troponin I (cTnI) als Ursache für die reversible Dysfunktion im stunned myocardium. *McDonough et al. (1999)* fanden heraus, dass eine kurze Ischämiephase des Herzens zunächst zu einer Degradation des TnI durch Verlust einer Aminosäuresequenz am C-terminalen Ende führt. Bei länger andauernder Hypoxie mit der Folge einer myokardialen Infarzierung kam es unter experimentellen Bedingungen zu einem Verlust einer weiteren Aminosäuresequenz im Bereich des N-terminalen Endes und damit zu weiteren Veränderungen am Troponinmolekül. Solche veränderten Formen des TnI führen laut *McDonough* zu einer kovalenten Verbindung mit dem N-terminalen Ende des TnC, welches für die Bindung von regulatorischem Ca^{2+} zuständig ist, sowie zu einer kovalenten Bindung mit dem C-terminalen Ende von TnT, welches für die Weiterleitung des Ca^{2+} -Signals an Tropomyosin (Tm) zuständig ist. Es kann also geschlußfolgert werden, dass derartige Veränderungen des TnI in eine alterierte Ca^{2+} -Ansprechbarkeit der Myofilamente münden.

TnI ist allerdings nicht nur für Ca^{2+} -abhängige Aktivierung der Myofilamente zuständig, sondern spielt auch eine entscheidende Rolle im Rahmen sympathischer Aktivierungsmechanismen. Die Phosphorylierung von TnI durch die PKA, z. B. unter β -adrenerger Stimulation, sowie durch die PKC, z. B. unter Stimulation durch Ang II, sind dabei von entscheidender Bedeutung. Eine Phosphorylierung durch die PKA mündet in einer verminderten Ca^{2+} -Affinität des TnC und damit in einer beschleunigten Relaxation.

Wie bei *McDonough et al. (1999)* beschrieben (s.o.), kommt es im Rahmen myokardialer Ischämie zu einem Verlust mehrerer Aminosäuresequenzen im Bereich beider Moleküle des Troponins und damit zum Verlust der als Substrat sowohl für die PKA wie auch für die PKC dienenden Sequenzen. Die Modifikationen des Troponin sind reversibel, wenn neues Troponin gebildet wird.

In Untersuchungen von *Litwin et al. (1992)* an intakten Papillarmuskeln aus Herzen mit chronischer Infarzierung sahen wir eine verminderte und verlangsamte Kraftentwicklung nach elektrischer Stimulation der Muskelpräparate im Vergleich zu sham operierten Tieren. Auch konnte *Litwin* zeigen, dass gehäutete Fasern infarzierter Herzen auf eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} mit einem signifikant geringeren Kraftanstieg als entsprechende Fasern nicht-infarzierter Herzen reagierten. Auf β -adrenerge Stimulation mit Isoproterenol zeigten Fasern infarzierter Herzen nur einen unwesentlichen Anstieg der produzierten Kraft trotz einer deutlichen Zunahme des intrazellulären Ca^{2+} . Sham operierte Tiere hingegen wiesen unter der Behandlung mit einer β -adrenergen

Substanz einen Zuwachs der produzierten Kraft und der Geschwindigkeit der Kraftentwicklung auf.

4. Beeinflussung der Ca^{2+} -Sensitivität von Myozyten infarzierter Herzen durch Medikamentengabe

4.1. Blockade β -adrenerger Rezeptoren

Zur Aufrechterhaltung der Ventrikelfunktion nach myokardialer Infarzierung werden neurohumorale Systeme stimuliert. Die Aktivierung des sympathischen Nervensystems induziert einen erhöhten Noradrenalin-Spiegel (NA) im Plasma, was Tachykardie, erhöhte Kontraktilität, aber auch periphere Vasokonstriktion und damit vermehrte linksventrikuläre Arbeit auslöst. Im weiteren Verlauf werden diese zunächst als kompensatorisch anzusehenden Mechanismen für die Aufrechterhaltung der Ventrikelfunktion zunehmend unzureichend. Bekanntlich besteht eine direkte Korrelation zwischen Zuwachs an Plasma-NA bei Herzinsuffizienz und deren Schweregrad und Mortalität (*Cohn et al., 1984*).

Die medikamentöse Behandlung chronisch ischämisch geschädigter Herzen muß also die Aktivitäten des neurohumoralen Systems mitberücksichtigen. Der zugrundeliegende Mechanismus, der unter einer β -Blockade die Überlebenschance nach Myokardinfarkt verbessern soll, ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt.

Betarezeptorenblocker hemmen kompetitiv β -Adrenorezeptoren und reduzieren so die positiv-inotrope und positiv-chronotrope Wirkung von Katecholaminen am Herzen. Durch die Blockade der β_1 -adrenergen Rezeptoren wird das Herz-Minuten-Volumen und damit der myokardiale Sauerstoffverbrauch reduziert. Folge ist eine verbesserte Energiebereitstellung im Myokard und eine sogenannte Ökonomisierung der Herzarbeit (*Eichhorn et al., 1994*). Studien mit Betablockern bei Patienten nach Herzinfarkt, in denen sowohl die Gesamtmortalität als auch der plötzliche Herztod erfasst wurden, zeigen, dass Betablocker die Inzidenz beider Endpunkte in vergleichbarem Maße senken.

Warner konnte belegen, dass eine β -adrenerge Blockade die linksventrikuläre Funktion in Herzen mit myokardialer Infarzierung verbessert (*Warner et al., 1992*). Die Ejektionsfraktion stieg in der Studie von 21 % auf 30 %, und die linksventrikuläre

Funktion konnte von dem Stadium NYHA III auf NYHA II gebessert werden. Obwohl die meisten hämodynamisch günstigen Wirkungen einer Betablockertherapie innerhalb der ersten Woche nach Infarkt eintreten, wurde eine kontinuierliche Reduktion der Mortalität sogar bis in das 6. Therapiejahr dokumentiert (*Freemantle et al., 2000*).

In der vorliegenden Arbeit gingen wir der Fragestellung nach, ob sich die gesehenen Vorteile einer medikamentösen Therapie mit β -blockierenden Substanzen ursächlich in einer veränderten Ca^{2+} -Sensitivität oder einer veränderten maximal produzierten Kraft (F_{\max}) begründen.

Unter physiologischen Bedingungen kommt es während eines Aktionspotentials zum Anstieg des freien intrazellulären Ca^{2+} , zum einen durch vermehrten extrazellulären Einstrom durch die sogenannten L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle der äußeren Zellmembran, zum anderen durch einen hierdurch getriggerten, zusätzlichen Ca^{2+} -Einstrom aus dem SR. Der größte Teil des während der Systole freigesetzten Ca^{2+} stammt dabei aus dem SR. Die freigesetzte Menge ist bei diesem Vorgang stark abhängig vom jeweiligen Füllungszustand des SR, welcher wiederum mit dem Aktivitätsgrad der Ca^{2+} -ATPase des SR variiert. Je aktiver diese Pumpe ist, umso mehr Ca^{2+} kann gespeichert werden und steht damit im nächsten Kontraktionszyklus wieder zur Verfügung.

Unter adrenerger Stimulation kommt es nach dem Andocken von Katecholaminen an den β_1 -adrenergen Rezeptor zunächst zu einer Aktivierung der Adenylatzyklase und cAMP wird aus ATP gebildet. Damit wird die Wirkung des Neurotransmitters auf den intrazellulär agierenden second messenger cAMP übertragen. cAMP beeinflusst die Ca^{2+} -Homöostase im Sinne einer erhöhten Verfügbarkeit von intrazellulärem Ca^{2+} bei gleichzeitig beschleunigter Relaxation.

Brum et al. (1983) konnten nachweisen, dass es nach Injektion von cAMP und PKA in Herzzellen zu einer größeren Kraftentfaltung, aber auch zu einer schnelleren Relaxation kam. Ursächlich hierfür wurde eine erhöhte Phosphorylierung von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen oder eines benachbarten Regulatorproteins und ein damit verbundener erhöhter langsamer Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle angesehen (*Li et al., 1983*). Die Folge der Phosphorylierung sah *Li* in einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit dieser Kanäle.

Ein weiterer entscheidender Mechanismus sowohl für die positiv inotrope Wirkung als auch für die beschleunigte Relaxation ist die Aktivitätsänderung der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase (SERCA2). Deren Aktivität steigt bei Phosphorylierung des regulatorischen Proteins PL über cAMP- oder PKA-abhängige Signalwege unter Katecholaminwirkung an (*MacLennon et al., 1997, Brittsan & Kranias, 2000*).

Es kommt also über die Stimulation der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase zu einer rascheren Relaxation durch vermehrtes Abpumpen von Ca^{2+} in das SR und zu einer größeren Speicherung von Ca^{2+} in diesem. Das so gespeicherte Ca^{2+} steht dann im nächsten Kontraktionszyklus vermehrt zur Verfügung.

Kurzzeitige Ischämiephasen von etwa 10-15 min Dauer wirken sich nicht auf die Phospholambanphosphorylierung aus. Bei längerer Ischämiephase mit myokardialer Infarzierung tritt allerdings eine Dephosphorylierung auf (*Mubagwa, 1995*).

Kranias et al. (1998) veränderten das PL-Gen in embryonalen Stammzellen von Mäusen, den sogenannten PL-Knockout-Mäusen, in der Weise, dass ein funktionstüchtiges PL in diesen Tieren nicht mehr vorlag. Das SR dieser Tiere wies eine deutlich höhere Ca^{2+} -Aufnahme im Vergleich zu den Kontrolltieren auf. Diese ließ sich auch nach Stimulation mit Isoproterenol nicht weiter steigern.

Eine β_1 -adrenerge Stimulation führt also über Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase, insbesondere durch eine Erhöhung der Konzentration an intrazellulärem Ca^{2+} zu einer positiven Inotropie. Für die beschleunigte Relaxation ist neben den oben genannten Mechanismen auch die Phosphorylierung von Tn-I durch die PKA von Bedeutung, da hierdurch die Abdissoziation von Ca^{2+} von TnC beschleunigt wird.

Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase, z. B. unter β -adrenerger Stimulation oder Inhibition, gehen also mit einer veränderten Kontraktilität von Herzmuskelfasern einher. Änderungen der Ca^{2+} -Sensitivität hingegen nehmen Einfluß auf die Kontraktilität bei gleichbleibender Konzentration an freiem intrazellulärem Ca^{2+} . Die Zunahme der Ca^{2+} -Sensitivität kann so eine veränderte Ca^{2+} -Homöostase, z. B. bei verringerter Verfügbarkeit von Ca^{2+} , kompensieren. Um eine mögliche veränderte Kontraktilität von Myozyten nach Infarkt unter medikamentöser Therapie unabhängig von Membranprozessen beurteilen zu können, verwendeten wir ein Tiermodell mit gehäuteten Muskelfasern

In den mit Betablocker behandelten Gruppen sahen wir eine signifikant erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität im Vergleich zur Placebo Gruppe. Der HILL Koeffizient veränderte sich jedoch nicht. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit der allgemeinen Datenlage (*Heilbrunn, 1989*).

Es ist bekannt, dass Tn-I in Katecholamin-behandelten Herzen in höherem Maße phosphoryliert vorliegt als in Kontrollherzen (*Solaro et al., 1976*). Eine größere

Phosphorylierung von Tn-I bedeutet eine Reduktion der produzierten Kraft bei submaximalen Ca^{2+} -Konzentrationen. Die maximal produzierte Kraft bleibt dabei allerdings unverändert (*Herzig et al., 1981*). β -blockierende Substanzen verhindern das Andocken von Katecholaminen an den β -Rezeptor und verringern somit die Phosphorylierung von Tn-I. Es resultiert eine höhere Ca^{2+} -Sensitivität.

Ein weiterer Effekt veränderter Kontraktilität nach myokardialer Infarzierung ist in der veränderten Expression von β -adrenergen Rezeptoren zu sehen. Allerdings gibt es in der Literatur diesbezüglich sehr unterschiedliche Aussagen: In unbehandelten Herzen mit schwerer myokardialer Dekompensation nach Infarkt kommt es bei einigen Autoren zu einem signifikanten Abfall der β -Rezeptoren-Dichte und zu einer verminderten basalen Adenylatzyklase Aktivität (*Warner et al., 1992; Sethi et al., 1997*). Dem widersprechend stehen Untersuchungen isolierter Myozyten aus Herzen mit chronischer myokardialer Infarzierung, bei denen eine unveränderte Antwort auf β -adrenerge Stimulation sowie eine unveränderte β -Rezeptorendichte und cAMP-Konzentration trotz echokardiografisch gesicherter eingeschränkter linksventrikulärer Pumpfunktion im Vergleich zu sham operierten Tieren verzeichnet werden konnte (*Prahash et al., 2000*). Ein möglicher Erklärungsansatz dieser unterschiedlichen Ergebnisse kann in der jeweils untersuchten Region des infarzierten Ventrikels gesehen werden. So ist bei *Sethi et al.* nicht klar, welche Regionen des linken Ventrikels genau untersucht wurden, während bei *Prahash et al.* ausschließlich Myozyten nicht-infarzierter und von der Infarktregion entfernter Areale als Grundlage für ihre Untersuchungen nutzten. Weitere Studien konnten aufzeigen, dass die β -Rezeptorendichte in entfernten, nicht-infarzierten Arealen des LV 5 Wochen nach Myokardinfarkt im Vergleich zu sham operierten Tieren unverändert ist. Im Gegensatz hierzu bestand eine deutliche Reduktion der β -Rezeptorendichte in dem Gebiet, welches unmittelbar an die Infarktzone grenzte (*Gu et al., 1998; Kompa et al., 1999*). Eine Downregulation von β -Rezeptoren ist also nicht immer als Ursache einer verminderten Kontraktilität in Herzen nach myokardialer Infarzierung anzusehen.

Die Gabe von β -blockierenden Substanzen hingegen resultiert bekanntermaßen in einer vermehrten β -Rezeptorendichte und in einer Erhöhung der Ca^{2+} -Ansprechbarkeit der Myofilamente (*Heilbrunn et al., 1989*). Auf der anderen Seite gibt es auch einige β -blockierende Substanzen, die die Ventrikelfunktion verbessern ohne die β -Rezeptorendichte signifikant zu verändern (*Bristow et al., 1993*). Eine erhöhte β -

Rezeptorendichte ist also nicht der alleinige Mechanismus einer verbesserten linksventrikulären Funktion unter β -Blockade.

4.2. ACE-Hemmer

Das Renin-Angiotensin-System (RAAS) kann pharmakologisch auf verschiedenen Ebenen beeinflusst werden. Experimentelle und klinisch-pharmakologische Untersuchungen haben gezeigt, dass die Hemmung des Konversionsenzyms (ACE) bei verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen eine sinnvolle Therapie darstellt, die darüber hinaus den Vorteil einer möglichen kardioprotektiven und gefäßprotektiven Wirkung einschließt. Die kardioprotektive Wirkung der ACE-Hemmer besteht dabei in der Regression der Myokardhypertrophie, einer Verringerung der Ausbreitung des Infarktareals bei Gabe direkt nach Infarkt, sowie Senkung der Reperfusionsarrhythmien (*McAlister et al., 1997*). Die gefäßprotektive Wirkung besteht in der günstigen Beeinflussung von Proliferationsprozessen der Intima durch verschiedene Noxen, die den Endothelverband schädigen. *Yusuf et al. (2000)* beschrieben, dass der ACE-Inhibitor Ramipril die Prognose bei Patienten mit linksventrikulärer Dysfunktion und kardialen Risikofaktoren entscheidend verbessert. Ramipril konnte dabei die Mortalitätsrate und die myokardialen Infarkte in den folgenden Jahren signifikant verringern.

Zur Aufrechterhaltung des systemischen Drucks in Herzen mit myokardialer Infarzierung steigt der Angiotensin-II-Spiegel. Zusätzlich werden vermehrt NA aus den sympathischen Nervenendigungen und Adrenalin aus dem Nebennierenmark freigesetzt, die die Wirkung des Angiotensin II (Ang II) weiter verstärken. Ang II reguliert dabei u.a. zentral und peripher den Blutdruck, stimuliert die Synthese und Sekretion von Aldosteron aus der Nebenniere und fördert die Entwicklung von Hypertrophie in Muskelzellen.

Die zentrale Rolle des RAAS in der Blutdruckregulation, sowie im Elektrolyt- und Wasserhaushalt, macht die teilweise schwerwiegenden Auswirkungen verständlich, die Veränderungen in der Konzentration oder Aktivität der einzelnen RAAS-Komponenten im Organismus zur Folge haben.

Für das hier verwendete Ramipril als Hemmstoff des ACE wurde im Tierexperiment eine besonders ausgeprägte kardioprotektive Wirkung nachgewiesen, die für die Regression der Myokardhypertrophie bei Patienten mit Myokardinfarkt von klinischer Bedeutung ist (*HOPE-Studie, 2000*).

In der vorliegenden Studie zeigte sich, dass sowohl die alleinige Behandlung mit dem ACE-Hemmer Ramipril als auch die kombinierte Behandlung (ACE-Hemmer plus Betablocker) die Steigung der Kraft- Ca^{2+} -Relation von Fasern aus nicht-infarzierten Arealen des LV, dargestellt durch den HILL-Koeffizienten, im Vergleich zur Placebo Gruppe normalisierte, also steigerte. Die Ca^{2+} -Sensitivität veränderte sich im Vergleich zu der Placebo Gruppe dabei nicht. Dies scheint also kein zusätzlicher Effekt des ACE-Hemmers Ramipril zu den oben angesprochenen Kompensationsmechanismen zu sein. Es ist allgemein bekannt, dass in Herzen mit chronischer myokardialer Infarzierung Defekte der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase und der Ca^{2+} -Aufnahme in das SR auftreten (*Afzal et al., 1996*) und dass es zu einer verminderten Gen-Expression der Ca^{2+} -ATPase des SR kommt (*Mac Lennon et al., 1997*). Da das SR eine wichtige Rolle in der Regulation der kardialen Kontraktilität spielt, wurde angenommen, dass der protektive Effekt der ACE-Hemmer möglicherweise auf Verbesserungen in diesem Bereich zurückgehen könnte. Die Behandlung von infarzierten Herzen mit dem ACE-Hemmer Captopril z. B. führte zu einer Normalisierung der Ca^{2+} -Aufnahme in das SR. Die Konzentration der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase und der mRNA konnten im Vergleich zu entsprechenden Kontrolltieren deutlich angehoben werden (*Shao et al., 1999*). Dies ließ sich für andere ACE-Hemmstoffe ebenfalls bestätigen (*Yamaguchi et al., 1998*). Da in der hier vorliegenden Studie Veränderungen der Kraft- Ca^{2+} -Relation unabhängig von Membranprozessen untersucht wurden, scheiden die oben genannten Veränderungen als Begründung für die von uns festgestellten Änderungen des HILL Koeffizienten aus.

Der HILL Koeffizient und damit die Steilheit der Kurve ist möglicherweise durch unterschiedliche Troponin-Isoformen bedingt. Wie bereits erwähnt, führt ein Austauschen des in der Skelettmuskulatur vorhandenen endogenen Troponins mit kardialem Troponin zu einer wesentlich steileren Kraft- Ca^{2+} -Kurve (*Brenner et al., 1999*).

Wagner et al. (1997) führten Untersuchungen an intakten Papillarmuskeln aus infarzierten Rattenherzen durch und sahen, dass es unter ACE-Hemmer Therapie 6 Wochen nach Infarkt zu einer weitgehenden Normalisierung der Kontraktilität im Vergleich zu sham operierten Tieren kam.

Weiterführende Arbeiten müssen nun untersuchen, ob und in welchem Maße ACE-Hemmer die mögliche Expression der Isoformen des Troponin beeinflussen.

4.3. Vergleich zwischen einfacher und kombinierter Behandlung

Experimentelle wie auch klinische Studien konnten eine Verbesserung der kardialen Funktion bzw. eine Unterdrückung der Hypertrophieentwicklung nach Gabe eines Betablockers (*Warner et al., 1992; Cherng et al., 1994*) bzw. eines ACE-Hemmstoffes (*Pfeffer et al., 1992; Litwin et al., 1992*) belegen. Wenig Erfahrung gibt es hingegen mit den Effekten einer kombinierten Therapie in Untersuchungen auf molekularer Ebene.

Obwohl man bei Betrachtung aktueller Studien mit β -Rezeptorenblockern nach Myokardinfarkt günstige Effekte für eine Kombinationstherapie aus beiden Substanzen in der Postinfarktphase erwarten kann, verfügen wir gegenwärtig über keine gute Evidenz aus kontrollierten klinischen Studien. Ebenso wie für eine ACE-Hemmer-Therapie konnte auch für die Behandlung mit Betablockern in der Postinfarktphase eine Reduktion des Risikos sowohl für das Auftreten einer Herzinsuffizienz als auch für plötzliche Herztodesfälle bei Patienten mit klinischen Zeichen einer Herzinsuffizienz gezeigt werden. Retrospektive Analysen aus der *SAVE-Studie* bei Patienten mit linksventrikulärer Dysfunktion zeigten diesbezüglich einen additiven Effekt einer Kombination aus ACE-Hemmern und Betablockern (*Vantrimpont et al., 1997*). In dieser Untersuchung führt der Einsatz von Betablockern zusätzlich zur Behandlung mit ACE-Hemmern zu einer signifikanten weiteren Reduktion des Risikos für kardiovaskuläre Todesfälle.

In der *AIRE-Studie* wurden 22% der Postinfarktpatienten mit Herzinsuffizienz zusätzlich zur Medikation eines ACE-Hemmers additiv mit einem Betablocker behandelt. Es zeigte sich eine signifikante Verminderung der Progression zur schweren Herzinsuffizienz und eine Risikoreduktion der Gesamtmortalität um bis zu 34% im Vergleich zu den mit einer Monotherapie behandelten Patienten.

Eine aktuelle Studie am Ratteninfarktmodell belegte, dass die kombinierte Gabe des ACE-Hemmers Ramipril und des Betablockers Metoprolol sowohl in der Reduktion von oxidativem Stress als auch in ihrem Einfluss auf Herzfunktion und -morphologie den Einzeltherapien als überlegen war (*Schulz et al., 2005*).

Die weitere Datenlage von Studien zur kontraktilen Funktion der Myofilamente nach myokardialer Infarzierung unter einer Kombinationstherapie aus Betablocker und ACE-

Hemmer ist derzeit spärlich. Weitere Untersuchungen werden, besonders im Hinblick auf die hohe klinische Relevanz, sicherlich nötig sein.

Wie bereits erwähnt, ist die Infarktausdehnung vom Beginn des Koronarverschlusses bis hin zur Nekrose innerhalb einiger Stunden nach Beschwerdebeginn abgeschlossen, und folglich muß jede Maßnahme zur Limitierung der Infarktgröße und des einsetzenden Vorganges des Remodeling möglichst frühzeitig eingeleitet werden. Es stellte sich hiermit die Frage, ob es entscheidend ist, welches Medikament im Rahmen einer Kombinationstherapie zeitlich früher gegeben wird und ob dies einen Einfluss auf das Remodeling hat. Zur Klärung dieser Frage wurden in unserem Modell die Gruppen mit der Kombinationstherapie (ACE-Hemmer plus Betablocker) näher untersucht. In der Gruppe A β erfolgte die alleinige Gabe des ACE-Hemmstoffes Ramipril an den ersten drei postoperativen Tagen, unter Hinzufügen des Betablockers Metoprolol ab dem 4. postoperativen Tag. Die Gruppe β A erhielt an den ersten drei postoperativen Tagen Metoprolol, gefolgt von einer Zugabe des Ramiprils ab dem 4. postoperativen Tag.

Vergleicht man die Ca²⁺-Sensitivität der Myofilamente zwischen den Gruppen A und A β und zwischen den Gruppen β und β A, so sind diese nicht signifikant voneinander verschieden. Vergleicht man im Gegensatz hierzu die Gruppe A mit der Gruppe β und die Gruppe A β mit der Gruppe β A bezüglich der Ca²⁺-Sensitivität, so finden sich signifikante Unterschiede. Dies könnte bedeuten, dass die Behandlung, die an den ersten drei postoperativen Tagen gegeben wird, von entscheidender Bedeutung für die weitere Entwicklung des Myokards in Bezug auf die Ca²⁺-Sensitivität ist. Die frühest mögliche Gabe von Medikamenten scheint nicht nur Einfluß auf die Limitierung der Infarktgröße (*Martorana et al., 1990*) und die arrhythmogenen Effekte kurz nach Infarkt (*Levine et al., 1982; Linz et al., 1998*) zu nehmen, sondern möglicherweise auch auf die Wochen später auftretenden Kompensationsmechanismen beider Ventrikel.

5. Beeinflussung der maximal produzierten Kraft (F_{max}) durch Medikamentengabe

Die maximalproduzierte Kraft pro Querschnitt war erniedrigt in Tieren mit myokardialer Infarzierung im Vergleich zu sham operierten Tieren. Die Gabe eines ACE-Hemmers oder Betablockers erbrachte im Vergleich zu Placebo behandelten Tieren keine Veränderung. Dies stimmt mit Ergebnissen anderer Studien überein (*Gao et al., 1994*;

Gwathmey et al., 1990) und könnte bedeuten, dass der Infarkt als solches, unabhängig von der medikamentösen Behandlung, einen mindernden Effekt auf F_{\max} hat. Die alleinige Gabe eines ACE-Hemmers in Tieren ohne chronische myokardiale Infarzierung scheint, verglichen mit den altersentsprechenden Kontrollgruppen, bezüglich F_{\max} ebenfalls keinen Effekt zu haben.

6. LV und RV im Vergleich

Veränderungen der rechtsventrikulären Funktion können auf verschiedene Weise zur kardialen Dysfunktion nach Infarkt beitragen. Es konnte insgesamt gezeigt werden, dass der RV nach linksmyokardialer Infarzierung ebenfalls funktionelle Veränderungen durchmacht. Als Folge der gestörten linksventrikulären Funktion steigt zunächst der Pulmonalvenendruck und, durch den hieraus resultierenden erhöhten pulmonalen Widerstand, der Pulmonalarteriendruck. (*Marmor et al., 1981*). Es kommt zu einer Erhöhung des rechtsventrikulären Füllungsdrucks und damit der zu leistenden Arbeit durch den RV. Eine Folge wird in der rechtsventrikulären Hypertrophie gesehen.

Im Rattenmodell erscheint der RV nach großer linksventrikulärer Infarzierung ähnlich dem LV signifikant hypertrophiert (*Pfeffer et al., 1985*). Auch in dem hier vorliegenden Modell konnte eine rechtsventrikuläre Hypertrophie nach Infarkt bestätigt werden. In Übereinstimmung mit den Erkenntnissen von *Pfeffer et al. (1985)* zeigten wir, dass eine frühzeitige Behandlung infarzierter Herzen mit dem ACE-Hemmer Ramipril die Hypertrophie des RV signifikant senkte.

Dies bestätigt, dass Ang II das Wachstum von Kardiomyozyten in vivo stimuliert und dass eine Hemmung des Ang II damit der Ausbildung einer Hypertrophie entgegenwirkt. Der Effekt der verminderten Hypertrophieentwicklung unter Gabe des ACE-Hemmstoffes Ramipril ließ sich in unserer Studie erstaunlicherweise nicht für den LV nachvollziehen. Diese Diskrepanz wurde bereits in anderen Studien beschrieben (*Wagner et al., 2000*). Sie ist vermutlich dadurch zu erklären, dass das Narbengewebe in die Berechnung des Herzgewichtes miteingeht und es somit zu einer rein rechnerischen „Unterschätzung“ der myokardialen Hypertrophie kommt. Damit würde der antihypertrophe Effekt des Ramipril in bezug auf den LV unterrepräsentiert bleiben.

Die Behandlung mit dem Betablocker Metoprolol erbrachte, wie erwartet, weder für den linken, noch für den rechten Ventrikel eine Veränderung des relativen Myokardgewichtes.

7. Untersuchung an Fasern nicht-infarzierter Herzen mit ACE-Hemmer-Behandlung

Zur Klärung der Frage, ob ACE-Hemmer ihre volle Wirksamkeit erst unter Infarktbedingungen entfalten, führten wir eine Versuchsreihe unter Gabe des ACE-Hemmers Ramipril in gleicher Dosierung an Tieren ohne Myokardinfarkt durch.

Die Behandlung mit dem ACE-Hemmer Ramipril reduziert dabei sowohl das Verhältnis LV/KG als auch RV/KG in den nicht-infarzierten Herzen. Eine Verminderung des relativen Herzgewichtes läßt sich in den Gruppen mit Infarkt und ACE-Hemmer Behandlung nur für den RV nachvollziehen. Dass dieser Effekt im Bereich des LV myokardial infarzierter Herzen nicht gesehen wurde, überrascht in Anbetracht der Ergebnisse aus der Versuchsreihe nicht-infarzierter, aber ACE-Hemmer behandelter Herzen. Es ist anzunehmen, dass in unserem Modell der Infarkt als solches oder die einsetzende Narbenbildung in der Größenordnung von durchschnittlich 36-43% den antihypertrophen Eigenschaften der ACE-Hemmer entgegenwirken bzw. diese aufheben.

Während sich bei der Behandlung von infarzierten Tieren mit dem ACE-Hemmer Ramipril keine signifikante Änderung der Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente im Vergleich zu SO oder P zeigte, konnten wir bei der Behandlung von nicht-infarzierten Tieren mit Ramipril im Bereich des LV eine deutliche Reduktion der Ca^{2+} -Sensitivität und damit der produzierten Kraft bei niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen im Vergleich zu den Kontrollgruppen feststellen. Die könnte bedeuten, dass die Gabe eines ACE-Hemmers unter physiologischen Bedingungen Einfluß auf die Ca^{2+} -Sensitivität von Myozyten im Sinne einer Desensitivierung nimmt, unter Infarktbedingungen dieser Einfluß aber möglicherweise durch hiervon unabhängige Mechanismen abgeschwächt oder aufgehoben wird.

In der Literatur gibt es derzeit nur sehr wenig Daten zu Untersuchungen der Ca^{2+} -Sensitivität von Myozyten herzgesunder Tiere mit chronischer ACE-Hemmer-Behandlung. Warum die Ca^{2+} -Sensitivität nach Gabe des ACE-Hemmstoffes Ramipril

abnimmt, bleibt bisher vollkommen unklar. Es konnte allgemein gezeigt werden, dass die PKC-abhängige Phosphorylierung des cTnI die Akto-Myosin-Interaktion der Myofilamente und damit die Rate der Kontraktion und Relaxation verringert (*Montgomery et al., 2002*). Dies führt zu einem Abfall der Ca^{2+} -Sensitivität der Myozyten. Die Gabe eines ACE-Hemmstoffes führt über eine veränderte Konzentration von Ang II zu einer verminderten Aktivierung der PKC und damit eigentlich zu einer relativen Erhöhung der Ca^{2+} -Sensitivität. Die zentrale Rolle der PKC bei der Regulation der kardialen Kontraktilität und bei der Entwicklung des chronischen Herzversagens nach myokardialer Infarzierung ist seit langem bekannt.

Bei *Takeishi* sahen wir am Modell des Aorten-Bandings an Meerschweinchen eine Normalisierung der Ca^{2+} -ATPase des SR (SERCA2a) und der Konzentration und Funktion des Phospholamban, verbunden mit einer Verbesserung des intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase aufgrund einer verminderten Aktivierung der PKC durch Gabe des ACE-Hemmstoffes Ramipril (*Takeishi et al., 1999*). Unter physiologischen Bedingungen führt eine Aktivierung der PKC also über die Phosphorylierung von cTnI und anderen sarkomerischen Proteinen zu einem Abfall der Ca^{2+} -Sensitivität. Die Gabe eines ACE-Hemmers sollte diesen Abfall erwartungsgemäß vermindern. Da Ang II eine zentrale Rolle in der Aktivierung der PKC spielt, mag die Beeinflussung der Aktivität der PKC durch ACE-Inhibition zu den positiven Effekten einer ACE-Hemmer-Pharmakotherapie nach chronischer myokardialer Infarzierung beitragen. Weitere Studien werden nötig sein, um zu klären, ob und in welchem Maße die Beeinflussung der PKC durch Gabe von ACE-Hemmstoffen auf die o.g. Mechanismen gesunder Herzen Einfluß nimmt.

Im Bereich des RV sehen wir eine im Vergleich zum LV deutlich erniedrigte Ca^{2+} -Sensitivität der Myozyten in der dreiwöchigen Kontrollgruppe (Kontrolle 3). Diese wird durch Gabe des ACE-Hemmers Ramipril nicht weiter erniedrigt. Betrachtet man aber die Gruppe ACE 6 und Kontrolle 6, so findet man Ergebnisse, die denen des LV entsprechen. Die Gabe von Ramipril führt auch hier zu einer signifikanten Herabsetzung der Ca^{2+} -Sensitivität der Myozyten. Während im LV der HILL Koeffizient zwischen Kontrolle 3 und 6 gleich bleibt, sinkt er im RV in der Kontrolle 6 signifikant ab. Es müssen also im Bereich des RV, zeitlich gesehen, andere entwicklungsphysiologisch ablaufende Mechanismen stattfinden als dies zum gleichen Zeitpunkt im LV der Fall ist. Es ist bekannt, dass entwicklungsphysiologische Veränderungen der Kontraktilität und Ca^{2+} -Sensitivität von Myozyten in Mäuseherzen auf einer veränderten Zusammensetzung der Myosin heavy chains (MHC) und einer veränderten Expression

der Troponin-Isoformen beruhen (Siedner et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass vom Embryonalstadium bis zum adulten Tier ein Abfall der Ca^{2+} -Sensitivität zu verzeichnen war. Der größte Abfall der Ca^{2+} -Sensitivität fand sich in Mäusen dabei im perinatalen Zeitraum und begründet sich bei Siedner et al. in einem zu diesem Zeitpunkt stattfindenden Austausch einer dem skelettalen, langsamen Troponin I (ssTnI) identischen Isoform durch das kardiale Troponin I (cTnI), ebenso in dem stattfindenden Austausch der β -MHC durch α -MHC. In der Postnatalzeit bis zum Erwachsenenalter von 6-8 Wochen p.n., kommt es zu einem weiteren, wenn auch weniger ausgeprägten Abfall der Ca^{2+} -Sensitivität. Da zu diesem Zeitpunkt keine weiteren Veränderungen in der Expression der MHC Isoformen zu finden sind, schien der Abfall der Ca^{2+} -Sensitivität in diesem Zeitraum allein in einem fortlaufenden Ersatz des ssTnI durch cTnI begründet. All diese Daten beziehen sich auf Untersuchungen an skinned fibres des LV. In den von uns gesicherten Daten ändert sich die Ca^{2+} -Sensitivität von Myozyten des LV zwischen den 3 und 6 Wochen alten Kontrolltieren nicht signifikant. Im Bereich des RV kommt es bei den 6 Wochen alten Kontrolltieren zu einem Anstieg der Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente. Dies lässt sich aus den bisherigen Studien in diesem Bereich nicht hinreichend erklären. Anzunehmen ist, dass entwicklungsphysiologische Veränderungen im Bereich des LV und RV aufgrund der unterschiedlichen hämodynamischen Erfordernisse nicht zeitgleich ablaufen und sich damit zumindest die gesehenen Unterschiede zwischen den beiden Ventrikeln einer Altersgruppe erklären lassen.

In der maximal produzierten Kraft des LV gab es keinen signifikanten Unterschied zu den Kontrollgruppen. Tendenziell erbrachten die mit dem ACE-Hemmer behandelten Gruppen des LV allerdings eine niedrigere absolut produzierte Kraft hervor. Bei großer Streubreite der Werte erreichte dieser Unterschied jedoch keine statistische Relevanz. Dieses Ergebnis findet sich in ähnlicher Weise auch bei den infarzierten Tieren wieder. So sehen wir im Bereich des LV und RV einen signifikanten Abfall von F_{max} aller Gruppen mit myokardialer Infarzierung im Vergleich zu SO, so dass die Infarzierung, unabhängig von einer medikamentösen Behandlung, als ursächlich hierfür anzunehmen ist. Vergleicht man nun die Gruppen mit myokardialer Infarzierung untereinander, so stellt man einen weiteren Abfall der absolut produzierten Kraft in den Gruppen A und A β des LV und der Gruppe A des RV im Vergleich zu P fest. Allerdings auch hier ohne statistische Signifikanz zu erreichen. Neben der Einflussgröße „Infarkt“, ist somit auch ein Einfluß des ACE-Hemmers Ramipril auf eine Erniedrigung der absolut produzierten

Kraft zu diskutieren. Dies kann als Ansatzpunkt weiterer Forschungen dienen. Warum wir im Bereich des RV in der Versuchsreihe nicht-infarzierter Herzen auch in den Kontrollgruppen eine deutlich erniedrigte absolut produzierte Kraft ($14-17\text{mN/mm}^2$) sehen, bleibt unklar und muss sicherlich methodenkritisch diskutiert werden.

Für den klinischen Alltag könnten die beobachteten Ergebnisse bedeuten, dass der verwendete ACE-Hemmer Ramipril nicht nur bei Behandlung infarzierter Herzen, sondern auch bei Behandlung von Herzen ohne eine myokardiale Infarzierung, wie dies z. B. bei klinischem Einsatz der ACE-Hemmer zur medikamentösen Blutdrucksenkung der Fall ist, in die Wachstums- und Proliferationsprozesse sowie in das kontraktile Verhalten eingreift. Über mögliche klinische Konsequenzen liegt bisher nur wenig Material vor (*Vogt et al., 1991*). Aufgrund des vielfältigen Einsatzspektrums der ACE-Hemmer heutzutage stellt dies sicherlich einen interessanten Ansatzpunkt für weitere Forschungen dar.

8. Phosphorylierung der Myosin-Leichtketten in Myozyten infarzierter Herzen

Das zu Beginn einer Kontraktion freigesetzte intrazelluläre Calcium bildet mit Calmodulin einen Komplex, der in der Lage ist, die Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK) zu aktivieren. Im aktivierten Zustand phosphoryliert diese MLCK die Myosin-Leichtketten (MLC), worauf es diesen möglich wird, mit Aktin zu interagieren und eine Kontraktion hervorzurufen. Die Dephosphorylierung der MLC führt zu einer Inaktivierung und Relaxation. Die normale basale Phosphorylierung der MLC ventrikulärer Trabekelfasern beträgt im Rattenherzen unter physiologischen Bedingungen 30-40%. Die Phosphorylierung der Myosin-Leichtketten (MLC) durch die Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK) wirkt modulierend auf die Kraftgeneration in der quergestreiften Muskulatur (*Morano et al., 1985*). Verschiedene Untersuchungen lieferten in der Vergangenheit Information über die Rolle der MLC-Phosphorylierung. Bei *Persechini et al. (1985)* wurde über eine positive Korrelation zwischen der Phosphorylierung der MLC und der produzierten Kraft an permeabilisierten Fasern des M. psoas vom Kaninchen berichtet. Ähnliche Effekte fanden sich an gehäuteten kardialen Trabekelfasern (*Morano und Rüegg, 1988*). Morano konnte u.a. zeigen, dass das kontraktile Verhalten von gehäuteten trabekulären Fasern des Schweins bei maximalen Calciumkonzentrationen ($\text{pCa } 4,33$) durch eine MLCK-induzierte Phosphorylierung der MLC nicht weiter

beeinflusst wurde. Unter submaximalen Calciumkonzentrationen (pCa 5,5) hingegen führte die Phosphorylierung der MLC durch die MLCK zu einem signifikanten Zuwachs der produzierten Kraft (*Morano et al., 1986*). Detaillierte Untersuchungen ergaben, dass sowohl bei der Skelett- als auch bei der Herzmuskulatur die Phosphorylierung der MLC mit einer erhöhten Ca^{2+} -Sensitivität und einem erniedrigten HILL-Koeffizienten einhergeht (*Sweeny et al., 1990*). Es gibt bis heute wenig Information über die Phosphorylierung der MLC unter pathophysiologischen Bedingungen und medikamentösem Einfluß.

Liu et al. (1995) beschrieben eine um 20-35% erhöhte Konzentration an MLCK im LV und RV bei Ratten 8 Wochen nach Ligatur der linken Koronararterie. Die Phosphorylierung der MLC des LV war 4 Wochen nach Infarkt unverändert, 8 Wochen nach Infarkt jedoch deutlich erniedrigt. Für den RV hingegen zeigte sich eine Erhöhung der MLCK und der MLC.

In der hier vorliegenden Arbeit sahen wir in den verschiedenen Gruppen keine Veränderung in dem Grad der Phosphorylierung der MLC des LV. Mit einem Phosphorylierungsgrad von 3% lag der Wert der Phosphorylierung der MLC deutlich unter den am Rattenmodell erwarteten 30-40%. Es muss daher von einer relevanten Dephosphorylierung ausgegangen werden. Da das Modell gehäuteter trabekulärer Fasern häufig zur Bestimmung des Phosphorylierungsgrades der MLC und dessen Wirkung auf das kontraktile Verhalten verwendet wird, postulieren wir, dass eine derartige Dephosphorylierung nicht während des Häutungsprozesses mit Triton-X-100 stattgefunden hat. Vielmehr muss davon ausgegangen werden, dass die beobachtete Dephosphorylierung der MLC in dem Zeitraum von der Entnahme der Herzen bis zur Aufbereitung der Fasern erfolgte. Änderungen im Phosphorylierungsgrad der MLC, wie sie unter pathophysiologischen Bedingungen vorkommen, tragen in diesem Modell somit nicht zur Erklärung der von uns gesehenen Änderungen der Ca^{2+} -Sensitivität bei. Methodenkritisch muss angemerkt werden, dass die Aussagekraft der Daten bzgl. einer Einflussnahme der Phosphorylierung der MLC auf die Kontraktilität erheblich eingeschränkt ist. Dennoch beweisen die Ergebnisse, dass eine Phosphorylierung der MLC nicht der alleinige zugrunde liegende Mechanismus einer unter pathophysiologischen Bedingungen veränderten Calcium-Sensitivität sein kann. Weitere Untersuchungen müssen die Einflussnahme verschiedener Phosphorylierungsgrade der MLC auf die Calcium-Sensitivität unter pathophysiologischen, z.B. postischämischen, Bedingungen klären.

V. Zusammenfassung

Der akute Myokardinfarkt (MI) auf dem Boden einer chronisch ischämischen Herzerkrankung ist einer der häufigsten Gründe für Krankheit und vorzeitigen Tod in den entwickelten Ländern. Eine Vielzahl von adaptativen Veränderungen konnte in diesem Prozess identifiziert werden. So kommt es im Verlauf als Folge des Infarktes zur Entwicklung einer kompensatorischen Herzhypertrophie beider Ventrikel und häufig zu einer ausgeprägten kardialen Funktionsstörung. Als zentraler Punkt wird hierbei eine veränderte Ansprechbarkeit und Kontraktilität der Myofilamente auf Calcium gesehen.

In dieser Studie wurde getestet, ob die Gabe des ACE-Hemmstoffes Ramipril, die Gabe des β -Blockers Metoprolol oder die kombinierte Behandlung aus beiden Stoffen in Ratten 6 Wochen nach chronischer myokardialer Infarzierung durch Ligatur der linken Koronararterie eine Veränderung der Calciumsensitivität von Myozyten aus nicht-infarzierten Arealen des linken und rechten Ventrikels im Vergleich zur Placebo behandelten Gruppe hervorruft. Es wurde ein Modell an Triton-X-100-gehäuteten Fasern gewählt. Nach der Häutung liegen die Myofilamente funktionell isoliert vor und können ohne Einfluß von Membranprozessen untersucht werden.

Wir konnten zeigen, dass in der chronischen Phase nach myokardialer Infarzierung eine linksventrikuläre Hypertrophie unabhängig von der medikamentösen Behandlung gegenüber sham operierten Herzen bestand. Diese Hypertrophie wurde lediglich in den Gruppen mit einer Kombinationsbehandlung aus ACE-Inhibitor und Betablocker im Vergleich zu den mit einer Monotherapie behandelten Gruppen signifikant gemindert.

Die Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente nach myokardialer Infarzierung war in beiden Ventrikeln zwischen Placebo behandelten und sham operierten Tieren nicht signifikant verschieden. Der HILL Koeffizient als Maß für die Kooperativität zeigte sich bei Tieren der Placebo Gruppe im Vergleich zu der sham operierten Gruppe deutlich erniedrigt. Als mögliche Erklärung wurde eine unterschiedliche Zusammensetzung der Troponin-Isoformen gesehen.

In den mit dem Betablocker Metoprolol behandelten Gruppen sahen wir eine signifikant erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität im Vergleich zur Placebo Gruppe. Der HILL Koeffizient veränderte sich hier jedoch nicht. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit der allgemeinen Datenlage und begründet sich u.a. in einer verringerten Phosphorylierung von Tn-I. Die Gabe des ACE-Hemmers Ramipril veränderte den HILL-Koeffizienten in der Weise, dass sich dieser im Vergleich zu der Placebo Gruppe erhöhte und damit der

sham operierten Gruppe angleichte. Die Ca^{2+} -Sensitivität blieb im Vergleich zu der Placebo Gruppe unverändert. Bei der Kombinationstherapie sahen wir eine ähnliche Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente in den Gruppen A und A β und in den Gruppen β und β A, wohingegen ein Vergleich der Gruppe A mit der Gruppe β und der Gruppe A β mit der Gruppe β A eine signifikant unterschiedliche Ca^{2+} -Sensitivität aufweist. Wir schlussfolgerten daraus, dass die an den ersten drei postoperativen Tagen gegebene Medikation entscheidenden Einfluß auf die weitere Entwicklung des Myokards und die Ca^{2+} -Sensitivität nimmt. F_{\max} zeigte sich in allen Gruppen mit chronischer myokardialer Infarzierung im Vergleich zur sham operierten Gruppe erniedrigt. Wir schlussfolgerten daraus dass der Infarkt als solches, unabhängig von der gegebenen medikamentösen Behandlung, auch in den nicht-infarzierten Arealen einen erniedrigenden Effekt auf die maximal produzierte Kraft hat.

In der von uns nachgeschalteten Versuchsreihe gleichaltriger Tiere reduziert die Behandlung mit dem ACE-Hemmer Ramipril interessanterweise ebenfalls das Verhältnis von Ventrikelgewicht zu Körpergewicht, ohne dass eine chronische myokardiale Infarzierung vorgelegen hat. Die Ca^{2+} -Sensitivität war im Vergleich zu den gleichaltrigen Kontrollgruppen signifikant erniedrigt, F_{\max} jedoch unverändert. Der Grund hierfür bleibt bis auf Weiteres unklar. Die derzeitige Datenlage über Untersuchungen der Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente von Tieren ohne myokardiale Infarzierung, aber mit ACE-Hemmstoff-Behandlung ist äußerst spärlich. Da die Behandlung mit ACE-Hemmstoffen in der Therapie der Herzinsuffizienz und der arteriellen Hypertonie ebenso ihren festen Platz gefunden hat, wie in der medikamentösen Therapie nach abgelaufenem Myokardinfarkt, stellt das von uns gesehene Ergebnis sicherlich einen interessanten Ansatzpunkt für weitere Forschungen auf diesem Gebiet dar.

Die gewonnenen Ergebnisse tragen zum Verständnis der pathophysiologischen Veränderungen myokardialer Kontraktilität nach chronischer myokardialer Infarzierung bei und eröffnen möglicherweise langfristig neue therapeutische Ansätze.

VI. Literaturverzeichnis

1. *Afzal N, Dhalla NS.* Sarcoplasmic reticular Ca^{2+} -pump ATPase activity in congestive heart failure due to myocardial infarction. *Can J Cardiol* 1996;12:1065-73
2. *Akella AB.* The cardiac troponin c isoform and the length dependence of Ca-sensitivity of tension in myocardium. *J Mol Cell Card* 1997;29:381-89
3. *Anand IS, Liu D, Chugh SS.* Isolated myocyte contractile function is normal in post-infarct remodeled rat heart with systolic dysfunction. *Circulation* 1997;96:3974-84
4. *Bernauer W.* The metabolic role of endogenous catecholamines in acute myocardial infarction: effects of reserpinization and of infused noradrenaline. *Eur J Pharmacol* 1983;88:161-68
5. *Beta-Blocker Heart Attack Trial Research Group.* A randomized trial of propranolol in patients with acute myocardial infarction. *J Am Med Ass* 1982;247: 1707-1377
6. *Brenner B, Chalovich JM.* Kinetics of thin filament activation probed by fluorescence of N-((2-(Iodoacetoxy)ethyl)-N-methyl)amino-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole-labeled troponin I incorporated into skinned fibers of rabbit psoas muscle: implications for regulation of muscle contraction. *Biophys J* 1999;77:2692-708
7. *Brilla CG, Zhou G, Matsubara L, et al.* Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone. *J Mol Cell Cardiol* 1994;26: 809-20
8. *Bristow MR, Minobe WA, Raynolds MV, et al.* Reduced β_1 -receptor messenger RNA abundance in the failing human heart. *J Clin Invest* 1993;92:2737-45
9. *Brittsan, A.G. Kranias, E.G.* Phospholamban and cardiac contractile function. *J Mol Cell Cardiol.* 32:2131-39, 2000
10. *Brum G, Flockerzi V, Hofmann F.* Injection of catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase into isolated cardiac myocytes. *Pflugers Arch* 1983;398:147-54
11. *Carafoli E, Bing EJ.* Myocardial failure. *J Appl Cardiol* 1988;3:3-18
12. *Caroni P, Reinlib L, Carafoli E.* Charge movements during Na^+ - Ca^{2+} exchange in heart sarcolemmal vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:6354-58
13. *Campbell DJ.* Circulating and tissue angiotensin system. *J Clin Invest* 1987;79:1-6
14. *Campbell DJ, Kladis A, Duncan AM.* Effects of converting enzyme inhibitors on angiotensin and bradykinin peptides. *Hypertension* 1994;23:439-49
15. *Cheng X, Liao YH, Li B, et al.* Effects of early treatment with metoprolol on

- myocardial inflammatory cytokine expression and heart function in rats with acute myocardial infarction. Chinese journal of cardiovascular diseases 2005;33:448-52
16. *Cherng WJ, Lian CS, Hood WB.* Effects of metoprolol on left ventricular function in rats with myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 1994;26:1335-47
 17. *Cohn JN, Levine TB, Olivary MT.* Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med* 1984;311:819-23
 18. *Consensus Trial Study group.* Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure: results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril survival Study (Consensus). *N Engl J Med* 1987;316:1429-35
 19. *Cruickshank JM, Degaute JP, Kuurne KL.* Reduction of stress/catecholamine-induced cardiac necrosis by beta 1-selective blockade. *Lancet* 1987;87:585-88
 20. *Davis SW.* Clinical presentation and diagnosis of coronary artery disease: stable angina. *Br Med Bull* 2001;59:17-27
 21. *Dhalla NS, Dixon IMC, Rupp H.* Experimental congestive heart failure due to myocardial infarction: sarcolemmal receptors and cation transporters. *Basic Res Cardiol* 1992;86, Suppl 3 13-23
 22. *Eichhorn EJ, Heesch CM, Barnett JH, et al.* Effect of metoprolol on myocardial function and energetics in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Am Coll Cardiol.* 1994;24:1310-20
 23. *Fabiato A, Fabiato F.* Effects of magnesium on contractile activation of skinned cardiac cells. *J Physiol* 1975;249:497-517
 24. *Feldmann AM, Cates AE, Veazey WB, et al.* Increase of the 40.000-mol wt pertussis toxin substrate (G-Protein) in the failing human heart. *J Clin Invest* 1988;82:189-97
 25. *Fellenius E, Hansen CA, MjØs O, et al.* Chronic infarction decreases maximum cardiac work and sensitivity of heart to extracellular Calcium. *Am J Physiol* 1985;249:H80-87
 26. *Francis GS, Goldsmith SR, Olivary MT.* The neurohumoral axis in congestive heart failure. *Ann Intern Med* 1984;101:370-77
 27. *Freemantle N, Cleland J, Young P, et al.* Review: long-term Betablocker use reduces mortality after myocardial infarction. *Evidence-Based Medicine* 2000;5:12

28. Gao WD, Backy PH, Azan-Backy M, et al. Myofilament Ca^{2+} -sensitivity in intact vs. skinned rat ventricular muscle. *Circ Res* 1994;74:408-15
29. Garvey JL, Kranias EG, Solaro RJ. Phosphorylation of C-protein, troponin I and phospholamban in isolated rabbit hearts. *Biochem J* 1988;249:709-714
30. GISSI –1-Investigators. Effectiveness of intravenous thrombolytic treatment in acute myocardial infarction. *Lancet* 1986;1:397-401
31. Granzier HL, Labeit S. The giant protein titin. A major player in myocardial mechanics, signaling and disease. *Circ Res.* 2004; 94:284-95.
32. Gu XH, Kompa AR, Summers RJ. Regulation of β -adrenoceptors in a rat model of cardiac failure: effect of perindopril. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;32:66-74
33. Gwathmey JK, Hajjar RJ. Relationship between steady-state force intracellular Calcium in intact human myocardium: index of myofibrillar responsiveness to Ca^{2+} . *Circ* 1990;82:1266-78
34. Haitsma DB, Bac D, Raja N, et al. Minimal impairment of myocardial blood flow responses to exercise in remodeled left ventricle early after myocardial infarction, despite significant hemodynamic and neurohumoral alterations. *Cardiovasc Res* 2001;52:417-428
35. Hajjar RJ, Gwathmey JK. Direct evidence of changes in myofilament responsiveness to Calcium during hypoxia and reoxygenation in myocardium. *Am J Physiol* 1990;259:H784-H795
36. Heilbrunn SM, Shah P, Bristow MR, et al. Increased β -receptor density and improved hemodynamic response to catecholamine stimulation during long-term metoprolol therapy in heart failure from dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1989; 79:2881-89
37. Herzig JW, Köhler H, Pfitzer G, Rüegg JC, et al. Cyclic AMP inhibits contractility of detergent treated glycerol extracted cardiac muscle. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 1981;391:208-12
38. Herzig JW, Peterson JW, Solaro RJ, Ruegg J. Phosphate and vanadate reduce the efficiency of the chemo-mechanical energy transformation in cardiac muscle. *Adv Exp Med Biol* 1982;151:267-81
39. Holt E, Tonnessen T, Lunde P. Mechanisms of Cardiomyocyte Dysfunction in Heart Failure Following Myocardial Infarction in Rats. *J Mol Cell Cardiol* 1998;30:1581-93

40. *HOPE-Studie – Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators*. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, Ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. *New Engl J Med* 2000;342:145-53
41. *Huang XP, Pi YQ, Lee KJ, et al*. Cardiac troponin I gene knockout : a mouse model of myocardial troponin I deficiency. *Circ Res* 1999;84:1-8
42. *Hügel S, Horn M, de Groot M, et al*. Effects of ACE inhibition and beta-receptor blockade on energy metabolism in rats post myocardial infarction. *Am J Physiol* 1999;277:H2167-75
43. *Jorgensen AO, Shen AC, Daly P, et al*. Localization of Ca^{2+} + Mg^{2+} ATPase of the SR in adult rat papillary muscle. *J Cell Biol* 1982;93:883-92
44. *ISIS I First International Study of Infarct Survival; Collaborative Group*. Randomised trial of intravenous atenolol among 16 027 cases of suspected acute myocardial infarction: ISIS-1. First International Study of Infarct Survival Collaborative Group. *Lancet* 1986;2:57-66
45. *Kemi OJ, Arbo I, Hoydal MA, et al*. Reduced pH and contractility in failing rat cardiomyocytes. *Acta Physiol* 2006;188:185-193
46. *Kentish JC, ter Keurs HE, Ricciardi L, et al*. Comparison between sarcomere length-force relations of intact and skinned trabeculae from rat RV. Influence of Calcium concentrations on these relations. *Circ Res* 1986;58:755-68
47. *Kögler H, Rüegg JC*. Cardiac contractility: Modulation of Ca^{2+} -sensitivity by β -adrenergic stimulation. *Isr J Med Sci* 1997;33:1-7
48. *Kompa AR, Gu X-H, Evans BA, Summers RJ*. Desensitization of cardiac β -adrenoceptor signaling with heart failure produced by myocardial infarction in the rat. Evidence for the role of G_i but not G_s or phosphorylating proteins. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31:1185-1202
49. *Kranias EG, Li L, Chu G*. Cardiac myocyte Calcium transport in phospholamban knockout mouse: relaxation and endogenous CaMKII effects. *Am J Physiol* 1998;274:1335-47
50. *Kusuoka H, Porterfield JK, Weisman HF*. Pathophysiology / pathogenesis of stunned myocardium. Depressed Ca^{2+} activation of contraction as a consequence of reperfusion-induced cellular Ca^{2+} overload in ferret hearts. *J Clin Invest* 1987;79:950-61
51. *Kusuoka H, Marban E*. Cellular mechanisms of myocardial stunning. *Annu Rev*

- Physiol 1992;54:243-56
52. *Lakatta EG*. Length modulation of muscle performance in Frank-Starling Law of the heart. *The Heart and Cardiovascular System*. New York: Raven Press 1992;1325-51
53. *Levine TB, Francis GS, Goldsmith SR*. Activity of the sympathetic nervous system and renin-angiotensin system assessed by plasma hormone levels and their relation to hemodynamic abnormalities in congestive heart failure. *Am J Card* 1982;49:1659-66
54. *Levy D, Garrison RJ*. Prognostic implications of echocardiographically determined LV mass in the Framingham heart study. *N Engl J Med* 1990;322:1561-66
55. *Li P, Hofmann PA, Baosheng L, et al*. Myocardial infarction alters myofilament Calcium sensitivity and mechanical behavior of myocytes. *Am J Physiol* 1997;272:H360-H370
56. *Libby P, Ridker PM, Maseri A*. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002;105:1135-43
57. *Linz W*. Cardiac arrhythmias are ameliorated by local inhibition of angiotensin formation and bradykinin degradation with the converting-enzyme inhibitor ramipril. *Cardiovasc Drugs Ther* 1989;3:873-82
58. *Linz W, Schoelkens BA, Ganten D*. Converting enzyme inhibition specifically prevents the development and induces regression of cardiac hypertrophy in rats. *Clin Exp Hypertens* 1998;11:1325-50
59. *Litwin SE, Morgan JP*. Captopril enhances intracellular Calcium handling and beta-adrenergic responsiveness of myocardium from rats with postinfarction failure. *Circ Res* 1992;71: 797-807
60. *Liu X, Shao Q, Dhalla NS*. Myosin light chain phosphorylation in cardiac hypertrophy and failure due to myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 1995;27: 2613-21
61. *Luo W, Grupp IL, Harrer J et al*. Targeted Ablation of the Phospholamban Gene Is Associated With Markedly Enhanced Myocardial Contractility and Loss of β -Agonist-Stimulation. *Circ Res*. 1994;75:401-09
62. *McClellan G, Kulikovskaya I, Winegrad S*. Changes in cardiac contractility related to calcium-mediated changes in phosphorylation of myosin-binding protein C. *Biophys J*. 2001; 81: 1083-92
63. *Mac Lennon, D.H., Rice, W.J., Green, N.M*. The mechanism of Ca^{2+} -transport by

- sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases. *J Biol Chem* 1997;272:28815-18
64. *Marban E, Rink TJ, Tsien RW, et al.* Free Calcium in heart muscle at rest and during contraction measured with Ca^{2+} -sensitive microelectrodes. *Nature* Aug 1980;286:845-50
65. *Martorana PA, Kettenbach B, Breipohl G, et al.* Reduction of infarct size by local angiotensin-converting enzyme inhibition is abolished by a bradykinin antagonist. *Eur J Pharmacol* 1990;182:395-96
66. *McAlister FA, Teo KK.* Antiarrhythmic therapies for the prevention of sudden cardiac death. *Drugs* Aug 1997;54:235-52
67. *McDonough JL, Arrell DK, Van Eyk JE.* Troponin I degradation and covalent complex formation accompanies myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circ Res* 1999; 84:9-20
68. *Marmor A, Geltmann EM.* Functional response of the right ventricle to myocardial infarction: Dependence on the site of left ventricular infarction. *Circulation* 1981;64:1005-11
69. *Montgomery DE, Wolska BM, Pyle WG, Roman BB, Dowell JC, Buttrick PM, Koretsky AP, Del Nido P, RJ Solaro.* Alpha-Adrenergic response and myofilament activity in mouse hearts lacking PKC phosphorylation sites on cardiac TnI. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282: H2397-405
70. *Morano I, Hofmann F, Zimmer M, Rüegg JC.* The influence of P-light chain phosphorylation by myosin light chain kinase on the Ca^{2+} -sensitivity of chemically skinned heart fibres. *FEBS Lett* 1985;189:221-24
71. *Morano I.* Further studies on the effects of myosin light chain phosphorylation on contractile properties of skinned cardiac fibres. *Basic Res Cardiol* 1986;81:611-19
72. *Morano I, Bächle-Stolz C, Katus A, Rüegg JC.* Increased Ca^{2+} -sensitivity of chemically skinned human atria by myosin light chain kinase. *Basic Res Cardiol* 1988;83:350-59
73. *Morano I, Bletz C, Wojciechowski R, Rüegg JC.* Modulation of crossbridge kinetics by myosine isoenzymes in skinned heart fibres. *Circ Res* 1991;68:614-18
74. *Mubagwa K.* Sarcoplasmic reticulum function during myocardial ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc Res.* 1995;30:166-175

75. Nassar R., Malouf NN, Kelly MB. Force-pCa relation and troponin T isoforms of rabbit myocardium. *Circ Res* 1991;69 :1470-75
76. Packer M, Lee WH, Kessler PD, et al. Role of neurohormonal mechanisms in determining survival in patients with severe chronic heart failure. *Circulation* 1997;75(suppl IV): 80-92
77. Parsi RA, Heublein B, Pech H.-J., et al. Bewertung der Herzfunktion. 4. Mitteilung: Hämodynamische Veränderungen bei akutem Myokardinfarkt. *Dt. Gesundh.-Wesen* 1977;32:581-86
78. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Braunwald E. Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left ventricle of the rat. *Circ Res* 1985;84-95
79. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular Remodeling after clinical infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* 1990;81:1161-72
80. Pfeffer JM. Progressive ventricular dilatation in experimental myocardial infarction and its attenuation by angiotensin-converting enzyme inhibition. *Am J Cardiol* 1991;68:17D-25D
81. Pfeffer MA, Braunwald E, Moye LA, et al. Effects of Captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction: results of the Survival and Left Ventricular Enlargement Trial. *N Engl J Med* 1992;327:669-77
82. Portzehl H, Caldwell PC, Rüegg JC. The dependence of contraction and relaxation of muscle fibres from the crab. *Maia squinado* on the internal concentration of free Calcium ions. *Biochim Biophys Acta* 1964;79:581-91
83. Prahash AJC, Gupta S, Anand IS. Myocyte response to β -adrenergic stimulation is preserved in the non-infarcted myocardium of globally dysfunctional rat hearts after myocardial infarction. *Circulation* 2000;102:1840-46
84. Quinn FR, Currie S, Duncan AM, et al. Myocardial infarction causes increased expression but decreased activity of the myocardial $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in the rabbit. *J Physiol* 2003;533:229-42
85. Richardt G, Munch G, Neumann FJ. Systemic and cardiac catecholamines during elective PTCA and during immediate PTCA for acute myocardial infarction. *Basic Res Cardiol (Germany)* 1997;92:52-60

86. *Rüegg JC*. Calcium in muscle contraction. Cellular and molecular physiology. 2nd edn. Springer, Berlin Heidelberg NewYork,1992
87. *Sadoshima, Izumo S*. Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts: critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ Res* 1993;73:413-23
88. *Schulz S*. Untersuchungen zum myokardialen Sauerstoffradikal-Stoffwechsel am Tiermodell 30-36 Stunden und 6 Wochen nach Myokardinfarkt unter medikamentöser Therapie mittels Ramipril, Metoprolol und Kombinationstherapie Metoprolol/Ramipril. (Erscheinungsdatum 12.01.2005, <http://edoc.hu-berlin.de/docviews/abstract.php>)
89. *Sethi R, Dhalla KS, Beamish RE*. Differential changes in left and right ventricular adenylyl cyclase activities in congestive heart failure. *Am J Physiol* 1997;272:884-93
90. *Shao Q, Ren B, Zarain-Herzberg A, et al*. Captopril Treatment Improves the SR Ca²⁺-Transport in Heart Failure Due to Myocardial Infarction. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31:1663-72
91. *Shiner JS, Solaro RJ*. The Hill coefficient for Ca²⁺-activation of striated muscle contraction. *Biophys J* 1984; 46:541-43
92. *Siedner S, Krüger M, Schroeter M, Pfitzer G, Stehle R*. Developmental changes in contractility and sarcomeric proteins from the early embryonic to the adult stage in the mouse heart. *J Physiol* 2003; 548:493-505
93. *Solaro RJ, Moir AJ, Perry SV*. Phosphorylation of troponin I and the inotropic effect of adrenaline in the perfused rabbit heart. *Nature* 1976;262:615-17
94. *Solaro RJ*. Modulation of Cardiac Myofilament Activity by Protein Phosphorylation. Vol.1 New York: Oxford University Press; 2002
95. *Starling EH*. The Linacre Lecture on the Law of the heart. London: Longmans, Green & Co,1918
96. *Statistisches Bundesamt*. Sterbefälle nach den 10 häufigsten Todesursachen insgesamt und nach Geschlecht 2004, vom 13. Juni 2006
97. *Stauss HM, Zhu YC, Redlich T, et al*. Angiotensin-converting enzyme inhibition in infarct-induced heart failure in rats: bradykinin versus angiotensin II. *J Cardiovasc Risk* 1994;1:255-62

98. *Steele DS, Smith GL, Miller DJ.* The effects of taurine on Ca²⁺-uptake by the sarcoplasmic reticulum and Ca²⁺-sensitivity of chemically skinned rat heart. *J Physiol* 1990;422:497-517
99. *Strauss JD, Eyk JE, Wiesner RJ, Ruegg JC, et al.* Recombinant troponin I substitution and Calcium responsiveness in skinned cardiac muscle. *Pflugers Arch* 1996;431:853-62
100. *Sweeney HL, Stull JT.* Alterations of cross-bridge kinetics by myosin light chain phosphorylation in rabbit skeletal muscle: implications for regulation of actin myosin interaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:414-18
101. *Takeishi Y, Bhagwat A, Ball NA, Kirkpatrick DL, Walsh RA.* Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on protein kinase C and SR proteins in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1999; 276:53-62
102. *Tousoulis D, Davis GJ, Crake T, et al.* Vasomotion and nitric oxide bioactivity in diseased coronary arteries. *Heart* 2002;87:320-21
103. *Ungerer M, Böhm M, Elce JS, et al.* Altered expression of β -adrenergic receptors in the failing human heart. *Circulation* 1993;87:454-63
104. *Van der Velden J, Merkus D, Klarenbeek BR et al.* Alterations in Myofilament Function Contribute to Left Ventricular Dysfunction in Pigs Early After Myocardial Infarction. *Circ Res* 2004; published online Nov 4.
105. *Vantrimpont T, Rouleau JL, Wun CC.* For the SAVE Investigators. Additive beneficial effects of beta-blockers to angiotensin-converting-enzyme inhibitors in the Survival and Ventricular Enlargement (SAVE) Study. *J Am Coll Cardiol* 1997;29:229–33
106. *Vogt M, Motz W, Strauer BE.* Long-term treatment in arterial hypertension for protecting hypertrophic myocardium. *Basic Res Cardiol* 1991;86:223-33
107. *Wagner KD, Theres H, Born A, et al.* Contractile function of papillary muscle from rats with different infarct size after beta-adrenergic blockade and ACE-inhibition. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:2941-51
108. *Wang J, Liu X, Dhalla NS et al.* Increased expression of protein kinase C isoforms in heart failure due to myocardial infarction. *Am J Physiol.* 2003; 284: H 2277-87.
109. *Warner AL, Bellah KL, Raya TE, et al.* Effects of beta-adrenergic blockade on papillary muscle function and the beta-adrenergic receptor system in noninfarcted myocardium in compensated ischemic left ventricular dysfunction. *Circulation* Nov 1992;86:1584-95

110. *Wiemer G.* Ramiprilat enhances endothelial autacoid formation by inhibiting breakdown of endothelium-derived bradykinin. *Hypertension* 1992;18:558-563
111. *Wollert KC, Studer R, Doerfer K, et al.* Differential effects of kinins on cardiomyocyte hypertrophy and interstitial collagen matrix in the surviving myocardium after myocardial infarction in the rat. *Circulation* 1997;95:1910-17
112. *Yamaguchi F, Sanbe A, Takeo S.* Cardiac Sarcoplasmic Reticular Function in Rats with Chronic Heart Failure Following Myocardial Infarction. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:753-63
113. *Yamaguchi F, Sanbe A, Takeo S.* Effects of longterm treatment with trandolapril on sarcoplasmic reticular function of cardiac muscle in rats with chronic heart failure following myocardial infarction. *Br J Pharmacol* 1998;123:326-34
114. *Yamazaki T, Komuro I, Zou Y, et al.* Protein kinase A and protein kinase C synergistically activate the Raf-1 kinase/mitogen-activated protein kinase cascade in neonatal rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 1997;29:2491-501
115. *Yang YJ, Chen X, Ruan YM, et al.* Effects of atenolol and metoprolol on cardiomyocyte apoptosis and related gene expression after acute myocardial infarction in rats. *Acta Academiae Medicinae Sinicae* 2005;28:538-43
116. *Yusuf S, Sleight P, Pogue J, et al.* Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 2000;342:145-53
117. *Zannad F, Alla F, Dousset B.* Limitation of excessive extracellular matrix turnover may contribute to survival benefit of spironolactone therapy in patients with congestive heart failure: insights from the randomized aldactone evaluation study (RALES). Rales Investigators. *Circulation* 2000;102:2700-06
118. *Zarain-Herzberg, A., Afzal, N., Dhalla, N.S. et al.* Decreased expression of cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -pump ATPase in congestive heart failure due to myocardial infarction. *Mol Cell Biochem* 1996;163/164:285-90
119. *Zimmer HG, Gerdes AM, Lortet S, et al.* Changes in heart function and cardiac cell size in rats with chronic myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 1990;22:1231-43

Abkürzungsverzeichnis

AA/BA	Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung
APS	Diammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
CaMK II	Calzium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
CAMP	3'-5'-cyklo Adenosinmonophosphat
DAG	1,2-Diacylglycerol
DTE	Dithioerythritol
EDRF	Endothelium derived relaxing factor
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β -Aminoethylether)-N,N,N',N' Tetraacetic Acid
IEF	Isolelektrische Fokussierung
IP	Isolelektrischer Punkt
IP3	Inositol-1,4,5-Triphosphat
ISA	Intrinsische Aktivität
MLC	Myosin leichte Ketten Kinase
NA	Noradrenalin
NaN ₃	Natriumazid
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PKA/PKC	Proteinkinase A/C
PL	Phospholamban
RT	Raumtemperatur
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
SDS	Natriumdodecylsulfat
SL	Sarkomerlänge
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
Tn-I/Tn-C/Tn-T	Isoformen des Troponin
TRIS-HCl	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol Hydrochlorid

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

Danksagung

Großer Dank gilt Frau Professor Dr. med. G. Pfitzer für die Geduld und Unterstützung während der Durchführung meiner Dissertation.

Zudem danke ich Frau A. Richter für die Einweisung in die verschiedenen verwendeten Methoden und die Unterstützung bei der Laborarbeit. Dank gilt ebenfalls den Mitarbeitern im Labor der Inneren Medizin der Charité unter Leitung von Herrn Dr. med. H. Theres für die Durchführung der experimentellen Infarkte sowie Dr. J. Günther für die weitere Tierpräparation und die Bereitstellung des myokardialen Gewebes.

Bedanken möchte ich mich auch bei meiner Familie, die mich stets in so vielen Dingen unterstützt hat.

Erklärung

„Ich, Nicole Karen Wunderlich, erkläre hiermit, dass die Dissertation von mir selbst und ohne (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.“

Hamburg, den 20.12.07

Nicole Wunderlich