

Aus dem Bereich Innere Medizin III – Klinisch-Experimentelle Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
Prof. Dr. med. U. Laufs

**„Auswirkung einer Herzfrequenzreduktion durch I_(f)-Kanal-Inhibition
mittels Ivabradin auf die Endothelfunktion und Atherogenese
der ApoE^{-/-}-Maus“**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2009

vorgelegt von: Franka List
geb. am 29.04.1984 in Berlin

Inhaltsverzeichnis

1. ZUSAMMENFASSUNG	7
1.1. Hintergrund der Untersuchungen	7
1.2. Methoden und Ergebnisse	7
1.3. Bedeutung der Ergebnisse	7
1.4. Summary	8
1.4.1. Background	8
1.4.2. Methods and Results	8
1.4.3. Conclusion	8
2. EINLEITUNG	9
2.1. Das Gefäßendothel	9
2.2. Endotheliale Dysfunktion und Oxidativer Stress	10
2.3. Atherogenese	11
2.4. Physiologie und Pathophysiologie der Herzfrequenz	14
2.5. Pathophysiologische und klinische Bedeutung einer Herzfrequenzreduktion	15
2.5.1. Herzfrequenzsenkung durch $I_{(f)}$ -Kanal-Inhibition als neues Therapieprinzip der koronaren Herzkrankheit	17
2.6. Fragestellung	20
3. MATERIAL UND METHODEN	22
3.1. Material	22
3.1.1. Verwendete Substanzen	22
3.1.2. Verwendete Tiere	26
3.2. Methoden	26
3.2.1. Medikamentöse Behandlung der Versuchstiere	26
3.2.2. Messung von Blutdruck und Herzfrequenz	27

3.2.3.	Präparation der Tiere	28
3.2.4.	Messung der Endothelfunktion	29
3.2.5.	Kryoschnitte von Aorta und Herz	30
3.2.6.	Färbungen und Immunhistochemie	30
3.2.6.1.	Öl-Rot-Färbung	30
3.2.6.2.	Sirius-Red-Färbung	31
3.2.6.3.	Immunfluoreszenzfärbung von Makrophagen	32
3.2.6.4.	Immunfluoreszenzfärbung von Alpha-Aktin	33
3.2.7.	Auswertung der Atherosklerose	34
3.2.7.1.	Morphometrie	34
3.2.7.2.	Quantitative Zusammensetzung der Plaques	34
3.2.8.	Quantifizierung von vaskulärem oxidativen Stress	35
3.2.8.1.	Messung der Lipidperoxidation	35
3.2.8.2.	Messung der vaskulären Superoxidproduktion (L012-Assay)	36
3.2.8.3.	Fluoreszenzfärbung mit Dihydroethidium	37
3.2.8.4.	Messung der NADPH-Oxidase-Aktivität	37
3.2.9.	Statistische Auswertung	38
4.	ERGEBNISSE	39
4.1.	Die Wirkung von I _(H) -Kanal-Inhibition auf Herzfrequenz, Blutdruck und Lipidwerte von Wildtyp- bzw. ApoE ^{-/-} -Mäusen	39
4.2.	Die Herzfrequenzreduktion durch Ivabradin verbessert die Endothelfunktion in cholesterinreich gefütterten ApoE-defizienten Mäusen	39
4.3.	Die Reduktion der Herzfrequenz durch Ivabradin reduziert das Ausmaß atherosklerotischer Läsionen in ApoE ^{-/-} -Mäusen	40
4.4.	Die Reduktion der Herzfrequenz durch Ivabradin beeinflusst die Plaquemorphologie in ApoE ^{-/-} -Mäusen	41
4.5.	Die Herzfrequenzreduktion durch Ivabradin führt zu verminderter Aktivität der NADPH-Oxidase sowie zur Abnahme der Sauerstoffradikalfreisetzung	42

5. DISKUSSION	44
5.1. Applikationsformen von Ivabradin im Tiermodell, Wirkung auf Herzfrequenz und Lipidwerte in ApoE-defizienten Mäusen	44
5.2. Endothel und Atherosklerose	45
5.3. Wirkmechanismus – Oxidativer Stress?	47
5.4. Potentielle klinische Bedeutung der Befunde	48
6. LITERATURVERZEICHNIS	51
7. DANKSAGUNG	58
8. CURRICULUM VITAE	59

Abkürzungsverzeichnis

AngII	Angiotensin II
AP	Aktionspotenzial
ApoE ^{-/-}	Apolipoprotein E defizient
AT-II-Rezeptor- Antagonisten	Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonist
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
bpm	beats per minute, Schläge pro Minute
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CSF	Kolonie stimulierender Faktor
ED	endotheliale Dysfunktion
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
g	Gramm
HDL	High-Density-Lipoprotein
HF	Herzfrequenz
ICAM	Inter-Cellular Adhesion Molecule
IDL	Intermediate-Density-Lipoprotein
IGF	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor
IL	Interleukin
Kap.	Kapitel
KG	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzkrankheit
KO	Knock-out
l	Liter
LDL	Low-Density-Lipoprotein
LPO	Lipidperoxidation
Lsg	Lösung
LV-Funktion	Linksventrikuläre Funktion
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
Min	Minute

μmol	mikromolar
mmol	millimolar
nmol	nanomolar
NO	Stickstoffmonoxid
o.g.	oben genannt
oxLDL	oxidiertes LDL
p.d.	per day, pro Tag
p.o.	per os, oral
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
s.	siehe
SBD	systolischer Blutdruck
sog.	Sogenannt
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
VCAM	vaskuläres Zelladhäsionsmolekül
VLDL	Very-Low-Density-Lipoprotein
vs.	versus
vSMC	vaskuläre glatte Muskelzellen
WT	Wildtyp

1. ZUSAMMENFASSUNG

1.1. Hintergrund der Untersuchungen

Erhöhte Herzfrequenzen steigern die kardiovaskuläre Morbidität. Aus diesem Grund wurde geprüft, ob eine Herzfrequenzreduktion mittels Ivabradin einen Einfluss auf die Endothelfunktion sowie die Atherogenese in ApoE^{-/-}-Mäusen hat.

1.2. Methoden und Ergebnisse

Männliche ApoE^{-/-}-Mäuse wurden über einen Zeitraum von sechs Wochen mit einer fett- und cholesterinreichen Diät gefüttert und erhielten zusätzlich den I_(f)-Kanal-Inhibitor Ivabradin (10 mg/kg KG/p.d.) beziehungsweise ein Placebo (n=10 pro Gruppe). Ivabradin führte zu einer Senkung der Herzfrequenz (HF) um 13,4% (472±9 vs 545±11 bpm, $p<0.01$) ohne dabei Einfluss auf den Blutdruck oder die Fettwerte im Serum zu nehmen. Die endothelabhängige Relaxation von Aortenringen wurde durch die Zufütterung von Ivabradin signifikant verbessert ($p<0.01$). Desweiteren verringerte Ivabradin die Größe der atherosklerotischen Läsionen in der Aortenwurzel um >40% und in der Aorta ascendens um >70% ($p<0.05$). Ivabradin reduzierte die Aktivität der vaskulären NADPH-Oxidase auf 48±6% und führte zu einer Abnahme wichtiger Parameter der Superoxidproduktion sowie der Lipidperoxidation in der Aortenwand ($p<0.05$).

1.3. Bedeutung der Ergebnisse

Selektive Herzfrequenzreduktion durch den I_(f)-Kanal-Inhibitor Ivabradin reduziert das Ausmaß von atherosklerotischen Läsionen in der Aorta, verbessert die Endothelfunktion und senkt wichtige Marker des vaskulären oxidativen Stresses in ApoE^{-/-}-Mäusen.

1.4. Summary

1.4.1. Background

Elevated heart rate is associated with increased cardiovascular morbidity. We hypothesized that selective heart rate reduction may influence endothelial function and atherogenesis and tested the effects of the $I_{(f)}$ -current inhibitor ivabradine in ApoE^{-/-} mice.

1.4.2. Methods and Results

Male ApoE^{-/-} mice fed a high-cholesterol diet were treated with ivabradine (10 mg/kg/d) or vehicle for six weeks (n=10 per group). Ivabradine reduced heart rate by 13.4% (472±9 vs 545±11 bpm, $p<0.01$) but did not alter blood pressure or lipid levels. Endothelium dependent relaxation of aortic rings was significantly improved in ivabradine fed animals ($p<0.01$). Ivabradine decreased atherosclerotic plaque size in the aortic root by >40% and in the ascending aorta by >70%, $p<0.05$.

Ivabradine reduced vascular NADPH oxidase activity to 48±6% and decreased markers of superoxide-production and lipid peroxidation in the aortic wall ($p<0.05$).

1.4.3. Conclusion

Selective heart rate reduction with ivabradine decreases markers of vascular oxidative stress, improves endothelial function and reduces atherosclerotic plaque formation in ApoE^{-/-} mice.

2. EINLEITUNG

2.1. Das Gefäßendothel

Das Gefäßendothel gehört auf die Fläche bezogen zu den größten Organen des menschlichen Organismus ¹. Dieses einschichtige Endothel, das die innere Oberfläche der Blutgefäße auskleidet, bildet zusammen mit der Membrana elastica interna die sog. Tunica intima der Arterien. Durch die exponierte Lage zwischen Blutstrom und der glatten Gefäßmuskelschicht kommen dem Endothel neben Barrierefunktionen darüber hinaus wichtige humorale Eigenschaften zu. So übt diese innerste Gefäßzellschicht durch die Synthese von Prostazyklin, Thrombomodulin und anderen Substanzen eine hemmende Funktion auf den Gerinnungsprozess aus, wohingegen durch die Produktion des Plättchenaktivierenden Faktors, des von-Willebrand-Faktors und des Thromboxan A prothrombotische Einflüsse ausgeübt werden.

Durch die Expression von Adhäsionsmolekülen, wie beispielsweise dem Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1), dem Inter-Cellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) und dem Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) sowie Rezeptoren (z.B.. LDL-Rezeptoren) erleichtert das Endothel die Interaktion verschiedener zellulärer Bestandteile mit der Gefäßwand. Über die Synthese verschiedener Wachstumsfaktoren (z.B. IGF, CSF) und Zytokinen (u.a. IL-1, IL-6, IL-8) beeinflusst es zahlreiche weitere Stoffwechselbereiche ².

Gleichzeitig wird in den Endothelzellen das Peptid Endothelin gebildet, welches eine starke Vasokonstriktion auslösen kann ¹.

Ein weiterer und für die vaskuläre Integrität entscheidender vom Endothel synthetisierter Faktor ist das durch die endotheliale NO-Synthase freigesetzte Stickstoffmonoxid (NO). Dieses Molekül stellt einen potenten Vasodilatator dar und nimmt wesentlichen Einfluss auf die Regulation des Blutdrucks.

NO ist darüber hinaus für die Inhibition der Proliferation von vaskulären glatten Muskelzellen, die Hemmung der Plättchenaggregation sowie für die Ausbildung neuer Gefäßstrukturen, die sog. Angiogenese, zuständig. Desweiteren vermag das Stickstoffmonoxid Entzündungsprozesse zu hemmen, indem es zytokinvermittelt die

Expression von Adhäsionsmolekülen (beispielsweise VCAM-1, ICAM-1, MCP-1) reduziert und somit die Interaktion von Leukozyten mit dem Gefäßendothel inhibiert ³. Eine verminderte Synthese von Stickstoffmonoxid ist entscheidend mit einem Verlust von vasoprotektiven und antiinflammatorischen Mechanismen assoziiert.

2.2. Endotheliale Dysfunktion und Oxidativer Stress

Die endotheliale Dysfunktion (ED) stellt den wesentlichen initialen Schritt in der Pathogenese der Atherosklerose dar ³. Unter dem Begriff der ED versteht man die Einschränkung der endothelabhängigen Vasorelaxation durch eine verminderte Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid ⁴. Eine wichtige Rolle für die Genese der endothelialen Dysfunktion wird dem vaskulären oxidativen Stress beigemessen. Ursächlich für oxidativen Stress sind unter anderem die etablierten kardiovaskulären Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie, Rauchen, Diabetes mellitus und Hypercholesterinämie ^{3,5,6}.

Vaskulärer oxidativer Stress ist durch eine Dysbalance zwischen Sauerstoffradikal produzierenden und Radikal abbauenden Systemen, mit der Folge vermehrt anfallender reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), gekennzeichnet. Der Begriff der ROS umfasst eine Familie von Molekülen, die unter physiologischen Bedingungen der Immunabwehr eingedrungener Mikroorganismen dient ⁷. Bedeutsame Vertreter dieser ROS sind z.B. das Superoxidanion (O_2^-), Lipidradikale und das Hydroxylradikal ($HO\cdot$) ⁴. Die meisten dieser Repräsentanten verfügen über ein ungepaartes Elektron und können somit als reaktionsfreudige freie Radikale Moleküle in ihrer Umgebung, wie z.B. DNA, Proteine, Kohlenhydrate oder Lipide oxidieren. Hierzu reichen anfangs bereits wenige Radikale, da diese durch Kettenreaktionen neue ROS entstehen lassen. Sauerstoffradikale reagieren außerdem mit endotheliale NO zu vasoaktivem Nitrit bzw. Nitrat und hemmen so die endothelabhängige Vasorelaxation ⁴. Desweiteren führt eine erhöhte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies zur verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen (VCAM-1 und MCP-1), wodurch inflammatorische Prozesse begünstigt werden. Auch wird die Proliferation sowie die Migration von glatten Gefäßmuskelzellen (vSMC) stimuliert, Apoptosevorgänge in den Endothelzellen werden induziert und vaskuläre Umbauprozesse durch die Synthese von Matrixmetalloproteasen begünstigt. Weiterhin wird die Oxidation

von LDL-Cholesterin erleichtert. Oxidiertes LDL ist im Gegensatz zum nativen LDL in der Lage mit NO zu reagieren und dessen vasoprotektive Funktion zu hemmen^{4,8}.

Eine wichtige Quelle reaktiver Sauerstoffspezies ist die NADPH-Oxidase. Dieses im aktivierten Zustand membranständige, aus sechs Untereinheiten bestehende Enzym wird beispielsweise durch Angiotensin II, verminderten oder oszillatorischen Scheerstress und Thrombin aktiviert^{4,7-9}. Ein weiterer wichtiger ROS-Produzent ist die endotheliale NO-Synthase, die als Substrat die Aminosäure L-Arginin verwendet. Diese wird zu L-Zitrullin und NO reduziert, wobei die Reaktion molekularen Sauerstoff und Tetrahydrobiopterin als Cofaktoren benötigt¹⁰. In Abwesenheit des Substrats oder einer der Cofaktoren kommt es zur sogenannten Entkopplung der eNOS, wobei anstelle des Stickstoffmonoxids das Superoxidradikal produziert wird. Abgesehen von diesen beiden Quellen der ROS existiert eine Vielzahl anderer Enzymsysteme, die in der Lage sind das Sauerstoffmolekül zu einem Radikal zu reduzieren. Auch die Xanthin-Oxidase, eines der wichtigsten Enzyme des Nukleotidstoffwechsels, aus deren Reaktionswegen die Harnsäure hervorgeht, die mitochondriale Atmungskette, die Cyclo- und Lipoxygenase, das Cytochrom P450 und weitere Peroxidasen sind nennenswerte Quellen für Sauerstoffradikale^{4,8}.

2.3. Atherogenese

Die Atherosklerose ist die zugrundeliegende Ursache für wesentliche kardiovaskuläre Erkrankungen wie der koronaren Herzkrankheit und des Myokardinfarkts, der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit oder des Schlaganfalls³. Trotz fundamentaler Fortschritte der Medizin und das Wissen um Entstehungsmechanismen, Risikofaktoren (s. Kap. 2.2.) und Präventionsmöglichkeiten, bleibt die KHK Todesursache Nummer eins in den industrialisierten Ländern und verursacht in den USA jährlich 50 - 60% aller Todesfälle^{5,6,11,12}.

Der Prozess der Atherogenese ist ein multifaktorielles entzündliches Geschehen, an dessen Beginn die endotheliale Dysfunktion steht^{3,5}. Durch eine Dysbalance zwischen protektiven und pathogenen Faktoren, einer gesteigerten Permeabilität des Gefäßendothels und bedingt durch eine gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1, ICAM-1,

MCP-1 kommt es zur Extravasation von Lipoproteinen und zellulären Bestandteilen in die Gefäßwand. Die Extravasation von Entzündungszellen wird durch verschiedene Chemokine, wie beispielsweise dem MCP-1, oxLDL oder Osteopontin, die vom Endothel, den vSMC und aktivierten Monozyten ausgeschüttet werden, verstärkt ^{5,13}. In der Folge entsteht unter der Endothelzellschicht eine initiale entzündliche Läsion, die sogenannte „fatty streak“, die bereits in Gefäßwänden von Jugendlichen nachweisbar ist. Die eingewanderten Monozyten differenzieren in der Intima zu Makrophagen und nehmen das oxLDL, nicht jedoch das native LDL, über die Scavenger-Rezeptoren SR-A und CD 36 an ihrer Oberfläche auf. Da diese Rezeptoren jedoch nicht durch LDL-Akkumulation im Zellinneren herunter reguliert werden, führt dies zur massiven Aufnahme und Anreicherung von Cholesterinestern in den Zellen (nun Schaumzellen genannt), die schließlich den Zelltod sowie die Ablagerung von nekrotischem und fettreichem Material in der Läsion verursacht ^{6,14}. Gleichzeitig werden Lipoproteinpartikel auf der Makrophagenoberfläche als Antigen präsentiert, wodurch T-Zellen aktiviert und zur Proliferation sowie Chemokinsekretion angeregt werden. Somit wird die Entzündungsreaktion weiter verstärkt, ohne die zugrundeliegende Ursache beseitigen zu können ⁵.

Zusätzlich zum inflammatorischem Geschehen werden durch die Chemokine glatte Gefäßmuskelzellen sowie Kollagenfasern zur Proliferation und Einwanderung in die Läsion angeregt. Hier bilden sie eine Kollagenkappe, die den Fettkern und das nekrotische Material vom Gefäß abgrenzt. Dies hat eine Verdickung der Arterienwand zur Folge, die zunächst durch eine Vasodilatation kompensiert werden kann. Durch diese Neugliederung der Plaque, auch Remodelling genannt, wird die Läsion zunächst stabilisiert. Sollte die Plaquekappe dabei relativ zur Größe des Kerns und Masse der Entzündungszellen zu dünn sein, spricht man von der fortgeschrittenen, komplizierten Läsion, bei der eine erhöhte Vulnerabilität für Plaquerupturen besteht ^{5,6,15}.

Wird der atherogene Prozess im Folgenden nicht durch Wegfall der Triggerfaktoren gestoppt, kommt es durch von Makrophagen synthetisierte Matrixmetalloproteasen und andere proteolytische Enzyme zur Arrosion der Plaquekappe. Dies hat die Destabilisierung der Läsion zur Folge, wodurch Risse im Schulterbereich der Plaquekappe begünstigt werden. Somit kann nun thrombogenes Material aus der Läsion, v.a. der „tissue factor“ im

Fettkern, in Kontakt mit Gerinnungsfaktoren und Thrombozyten aus der Blutbahn kommen und eine Thrombose verursachen. Die Konsequenz für die Hämodynamik des Gefäßes ist eine partielle oder komplette Verlegung des Gefäßlumens mit einer Reduktion oder einem Sistieren des Blutflusses und der Induktion einer Ischämie in den distal gelegenen Gefäßabschnitten^{5,6,14,15}. Klinisch ist der Pathomechanismus der Plaqueruptur die wesentliche Ursache für das akute Koronarsyndrom¹⁵.

Das Tiermodell der Apolipoprotein E defizienten Maus

Ein etabliertes Tiermodell zur Untersuchung atherosklerotischer Prozesse stellt die Apolipoprotein E defiziente Maus (ApoE^{-/-}) dar. Apolipoprotein E ist Bestandteil von Chylomikronen, Very-Low-Density-Lipoproteinen (VLDL), Intermediate-Density-Lipoproteinen (IDL) sowie High-Density-Lipoproteinen (HDL) und vermittelt hauptsächlich über den LDL-Rezeptor die zelluläre Aufnahme dieser Lipoproteine. Auch andere wichtige Aufgaben im Fettstoffwechsel, wie beispielsweise den Rücktransport von Chylomikronenremnants zur Leber und die Distribution von Cholesterin im Gewebe, erfüllt das Apolipoprotein E¹⁶. Beim Tiermodell der ApoE^{-/-}-Maus kommt es bereits unter normaler Fütterung zur Hypercholesterinämie. Bei cholesterinreicher Ernährung zum Beispiel durch eine sog. „western type diet“ (zusammengesetzt aus 21% Fett, 19,5% Kasein und 1,25% Cholesterin) weisen ApoE^{-/-}-Tiere einen 13-fach gesteigerten Plasmacholesterinwert gegenüber Kontrolltieren auf. Bereits im Alter von zehn Wochen lassen sich atherosklerotische Läsionen ubiquitär im arteriellen Stromgebiet der ApoE-defizienten Maus nachweisen¹⁶. Morphologisch, d.h. in der Lokalisation der atherosklerotischen Plaques und in ihrer Zusammensetzung, gleicht die durch cholesterinreiche Fütterung in der ApoE^{-/-}-Maus induzierte Atherosklerose der humanen Form. Darüber hinaus lässt sich auch der initiale Schritt der Atherogenese, die endotheliale Dysfunktion, nachweisen. Vor diesem Hintergrund stellt die ApoE^{-/-}-Maus ein wesentliches Tiermodell zur Charakterisierung atherosklerotischer Prozesse dar.

2.4. Physiologie und Pathophysiologie der Herzfrequenz

Die Herzfrequenz (HF) ist eine der am einfachsten zu ermittelnden kardiovaskulären Stellgrößen. Aus dem Reich der Säugetiere ist bekannt, dass zwischen der durchschnittlichen Ruheherzfrequenz und der Lebenserwartung eine inverse halblogarithmische Beziehung besteht¹⁷. Kleine Säuger, bspw. Mäuse, haben im Vergleich zu Walen eine 35-fach höhere HF, jedoch ist ihre Lebenserwartung auf ein Zwanzigstel derer der Meeressäuger limitiert (**Abbildung 1**). Die Anzahl der während des gesamten Lebens getätigter Herzschläge ist unter den verschiedenen Arten erstaunlicherweise annähernd identisch¹⁷.

Eine Ausnahme hierzu bildet der Mensch, der trotz mittlerer Herzfrequenzen (70 Schläge/Minute) die höchste Lebensspanne unter den Säugetieren erreicht. Einen Erklärungsansatz hierfür bieten unter anderem die Errungenschaften der Zivilisation, beispielsweise auf dem Gebiet der Medizin und Hygiene.

Die Herzfrequenz beeinflusst wesentlich die myokardiale Energetik und Arbeitslast. Sie ist maßgeblich am Herz-Minuten-Volumen beteiligt (Produkt aus Schlagvolumen und Herzfrequenz) und bestimmt somit in hohem Maße den myokardialen Sauerstoffverbrauch. Die Kontrolle und Modulation der Herzfrequenz stellt eine wichtige Adaptation an unterschiedliche physiologische Bedingungen dar. So hängt beispielsweise die Koronarperfusion sowie das Sauerstoffangebot maßgeblich von der durch die HF regulierte Diastolendauer ab. Auch die Kontraktilität unterliegt einem gewissen Einfluss der Herzfrequenz. Durch die positive Kraft-Frequenz-Beziehung, den sog. Bowditch-Effekt, kommt es bei steigender Herzfrequenz zu einem Anstieg der Kontraktionskraft. Unter pathophysiologischen Bedingungen kommt es jedoch zu einer Änderung dieser Kraft-Frequenz-Korrelation. So führt beim insuffizientem Herzmuskel ein Anstieg der HF zu einer Abnahme der Kontraktilität und somit zu einem verminderten Herz-Minuten-Volumen^{18,19}. Desweiteren führt eine erhöhte HF im Rahmen der koronaren Herzerkrankung (KHK) zu einer Dysbalance zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot. Da die Verkürzung einer Herzaktion hauptsächlich auf Kosten der Diastole erfolgt, verschlechtert sich folglich die Koronarperfusion sowie das Sauerstoffangebot an das Myokard, wodurch der erhöhte Sauerstoffbedarf nicht mehr gedeckt werden kann. In der Folge kommt es zur koronaren Ischämie, welche sich klinisch im Rahmen pectanginöser Beschwerden manifestiert.

Abbildung 1:

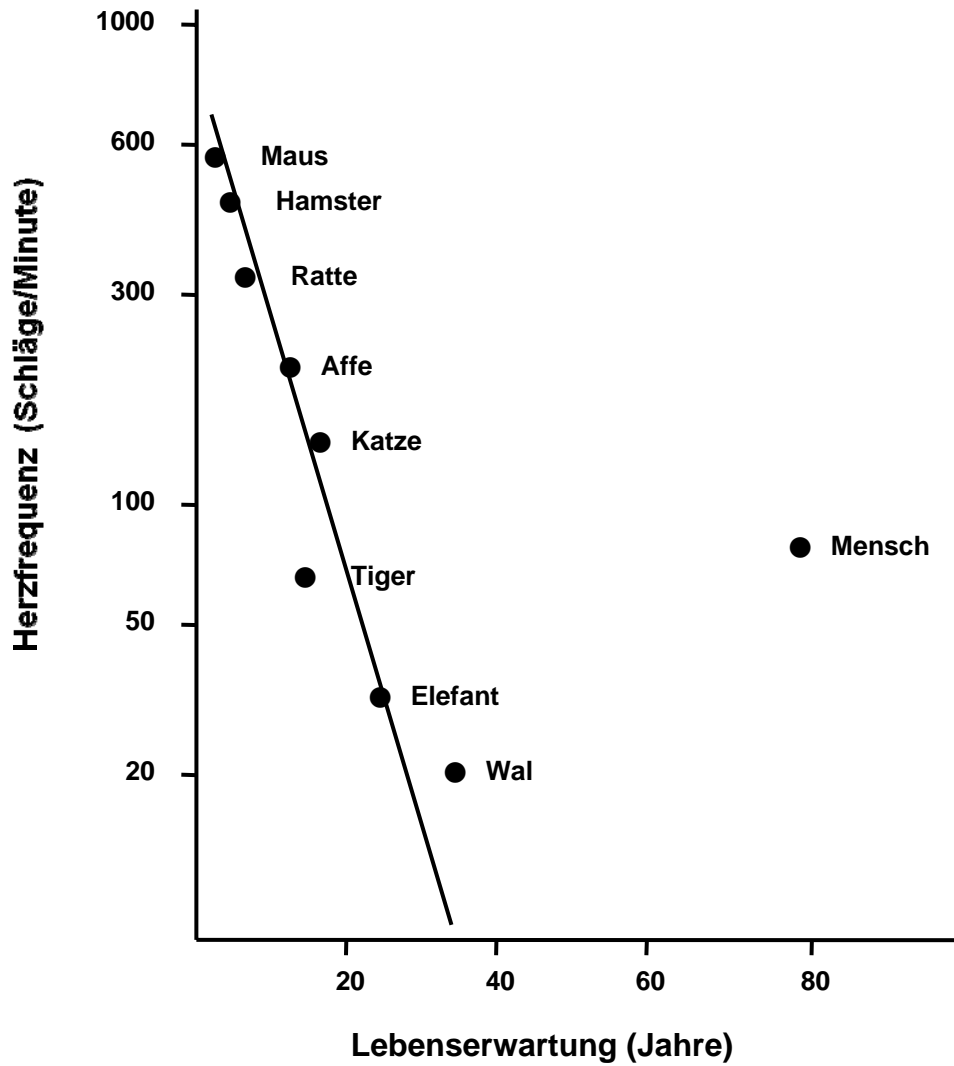


Abb. 1: Halblogarithmische Beziehung zwischen Ruheherzfrequenz und Lebenserwartung bei Säugetieren und Menschen (modifiziert nach Levine, Rest heart rate and life expectancy. J. Am. Coll. Cardiol. 30, 1104-1106 (1997)).

Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass eine erhöhte Herzfrequenz einen unabhängigen Risikofaktor für die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität sowohl im Bereich der Primärprävention als auch für kardiovaskulär erkrankte Patienten mit bereits manifester arterieller Hypertonie, koronarer Herzkrankheit oder nach erlittenem Myokardinfarkt darstellt²⁰⁻²⁴. Interessanterweise beginnt ein Anstieg der Sterblichkeit nicht etwa bei sehr hohen Herzfrequenzen sondern bereits bei Werten ab 80-90 Schlägen pro Minute²⁵. Diese Effekte sind unabhängig vom Alter und Geschlecht und lassen sich in Populationen mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund beobachten²⁶.

Einzelne klinische und tierexperimentelle Studien weisen darauf hin, dass eine, unter Ruhebedingungen gemessene, erhöhte Herzfrequenz, mit einer gesteigerten Progression atherosklerotischer Prozesse assoziiert ist. So konnte bei jungen Patienten, die an einem Myokardinfarkt verstarben, gezeigt werden, dass das Ausmaß der vorliegenden koronaren Atherosklerose mit einer höheren Herzfrequenz assoziiert war²⁷. Bereits im Jahr 1984 zeigten Beere und Mitarbeiter, dass cholesterinreich gefütterte Javaneraffen, die durch Ablation des Sinusknoten eine deutlich geringere Herzfrequenz als gleichaltrige Artgenossen hatten, eine fast um die Hälfte reduzierte Ausprägung der koronaren Atherosklerose aufwiesen²⁸. In späteren Versuchen konnte selbige Arbeitsgruppe im identischen Versuchsaufbau nachweisen, dass eine Reduktion der Herzfrequenz in Javaneraffen zu einer signifikanten Verringerung der atherosklerotischen Plaquerfläche an der Bifurkation der Arteria carotis communis führte²⁹. Die hier zugrunde liegenden molekularen und zellbiologischen Mechanismen und Effekte einer erhöhten Herzfrequenz auf vaskulärer Ebene sind bislang jedoch noch nicht oder nur unzureichend untersucht. Als mögliche pathophysiologische Erklärungsansätze werden ein durch eine beschleunigte Herzfrequenz verminderter Scheerstress^{30,31} und eine mit erhöhter HF einhergehende gesteigerte Steifigkeit der Gefäßwände angeführt^{30,32}.

2.5. Pathophysiologische und klinische Bedeutung einer Herzfrequenzreduktion

Die pathophysiologische Bedeutung der Herzfrequenz wird vor allem bei der koronaren Herzerkrankung (KHK) ersichtlich, da die koronare Perfusion und damit die Sauerstoffversorgung des Myokards maßgeblich von der durch die HF regulierte Dauer der Diastole determiniert wird. Eine Senkung der Herzfrequenz führt durch eine Verlängerung der Diastole zu einer Verbesserung der Koronarperfusion und somit zu einem verbesserten

myokardialen Sauerstoffangebot. Darüber hinaus nimmt bei geringerer HF der myokardiale Metabolismus ab, was wiederum zu einer Reduktion des myokardialen Sauerstoffverbrauchs führt. Unter klinischen Gesichtspunkten profitieren demnach vor allem Patienten mit einer symptomatischen KHK oder nach einem Myokardinfarkt von einer medikamentösen Frequenzsenkung.

Eine Senkung der Herzfrequenz kann bei kardiovaskulär gesunden Individuen bis zu einem gewissen Grad durch körperliches Training erreicht werden³³. Zur medikamentösen Herzfrequenzreduktion stehen Betablocker, Calciumantagonisten sowie Digitalisglykoside zur Verfügung. Bei Patienten mit KHK kommen in erster Linie die β 1-selektiven Adrenorezeptorblocker und Calciumantagonisten zur Anwendung. Für die Substanzgruppe der Betablocker ist eine Reduktion der kardiovaskulären Mortalität nach Myokardinfarkt und bei Herzinsuffizienz erwiesen. Für Patienten mit stabiler KHK ist dieser Nutzen jedoch nicht klar durch Studien belegt^{34,35}. Auch Calcium-Kanal-Antagonisten finden in der Therapie der KHK Anwendung, allerdings gibt es auch für diese Gruppe keinen gesicherten Hinweis auf einen prognostischen Vorteil bei KHK. Beide Wirkstoffgruppen weisen darüber hinaus Einschränkungen hinsichtlich ihres Nebenwirkungsprofils auf. So bestehen bei 11% der Patienten mit stabiler AP Kontraindikationen für Betablocker, wie beispielsweise allergisches Asthma bronchiale, Hypotonie oder AV-Blockaden^{36,37}.

$I_{(f)}$ -Kanäle und $I_{(f)}$ -Ionenstrom

Unter physiologischen Bedingungen wird der Herzschlag durch die Schrittmacheraktivität des Sinusknotens initiiert. Neben den Calciumkanälen vom L-Typ ($I_{Ca, L}$) und T-Typ ($I_{Ca, T}$), dem Natriumcalciumaustauscher und dem verzögerten Kaliumkanal I_K hat der erstmalig 1979 von Brown et al. beschriebene Schrittmacherstrom I_f über den I_f -Kanal für die spontane diastolische Depolarisation eine zentrale Bedeutung³⁶. Aufgrund der „ungewöhnlichen“ Stromeigenschaften, wie der Aktivierung der Kanäle durch Hyperpolarisation und der Modulierbarkeit durch das zyklische AMP (cAMP) erhielten sie die Bezeichnung „f“ für funny³⁶.

Neben den Zellen des Sinusknotens werden die $I_{(f)}$ -Kanäle auch in anderen Abschnitten des kardialen Reizleitungssystems, wie dem AV-Knoten oder den Purkinje-Fasern exprimiert³⁸. Es handelt sich um unspezifische Kationenkanäle, die hauptsächlich für einwärts

strömendes Kalium und Natrium permissiv sind und durch Hyperpolarisation bzw. Bindung von cyclischen Nukleotiden aktiviert werden (Synonym: HCN-Kanäle)³⁹⁻⁴¹.

Der Ablauf eines regulären Aktionspotenzials (AP) gestaltet sich wie folgt. Sobald am Ende des vorherigen Aktionspotenzials die durch den Kaliumausstrom I_K bedingte Repolarisationsphase einen Schwellenwert von -45mV erreicht, öffnet sich der $I_{(f)}$ -Kanal (maximale Öffnung bei -110mV). Der Kationeneinstrom führt zur frühen diastolischen Depolarisation, welche wiederum die Aktivierung der T- und L-Typ-Calcium-Kanäle bedingt, die die Depolarisation nun schneller vorantreiben. Ab einem Membranpotenzial von $-10/-20\text{mV}$ schließt der $I_{(f)}$ -Kanal erneut³⁹, der sich kurze Zeit später öffnende Kaliumkanal I_K führt erneut zur Repolarisation und ein neuer Erregungszyklus beginnt.

Zusätzlich kann die Öffnungswahrscheinlichkeit des $I_{(f)}$ -Kanals durch das vegetative Nervensystem beeinflusst werden, denn die Bindung von zyklischem Adenosin-Monophosphat (cAMP) an das intrazellulär gelegene C-terminale Ende des Kanals bewirkt, dass sich der Kanal auch schon bei weniger negativen Membranpotenzialen öffnet. Somit wird die frühe Phase der Depolarisation schneller eingeleitet, die Diastolendauer verkürzt und die Herzfrequenz steigt⁴². Da Stimuli des Sympathikus an Schrittmacherzellen, beispielsweise durch die Bindung von Noradrenalin an β -Rezeptoren, über die Aktivierung der Adenylatzyklase zu einer intrazellulären Erhöhung der cAMP-Konzentration führen, ist die vegetative Regulierung der Herzfrequenz, beispielsweise die Steigerung der HF bei Stress und Belastung, nachvollziehbar^{36,39}. Dementsprechend führt ein parasympathischer Stimulus über die Erregung muskarinerger Acetylcholinrezeptoren zu einer Abnahme der cAMP-Konzentration und somit zur Reduktion der HF^{39,43,44} (**Abbildung 2**).

2.5.1. Herzfrequenzsenkung durch $I_{(f)}$ -Kanal-Inhibition als neues

Therapieprinzip der koronaren Herzerkrankung

Mehrere Inhibitoren des Schrittmacherkanals $I_{(f)}$ wurden entwickelt. Die 1994 erstmals beschriebene Substanz Ivabradin (S16257) ist der einzige $I_{(f)}$ -Inhibitor, der Eingang in die klinische Therapie gefunden hat^{45,46}. Ivabradin gelangt durch den geöffneten Kanal ins Zellinnere und inhibiert diesen von intrazellulär. Durch Bindung an die intrazelluläre Komponente des geöffneten Kanals wird der Kationenstrom blockiert. Somit wird der Anstieg der frühen diastolischen Depolarisation reduziert, woraus eine Senkung der Herzfrequenz resultiert^{47,48}. Andere Ionenkanäle, insbesondere Kalziumkanäle, werden

Abbildung 2:

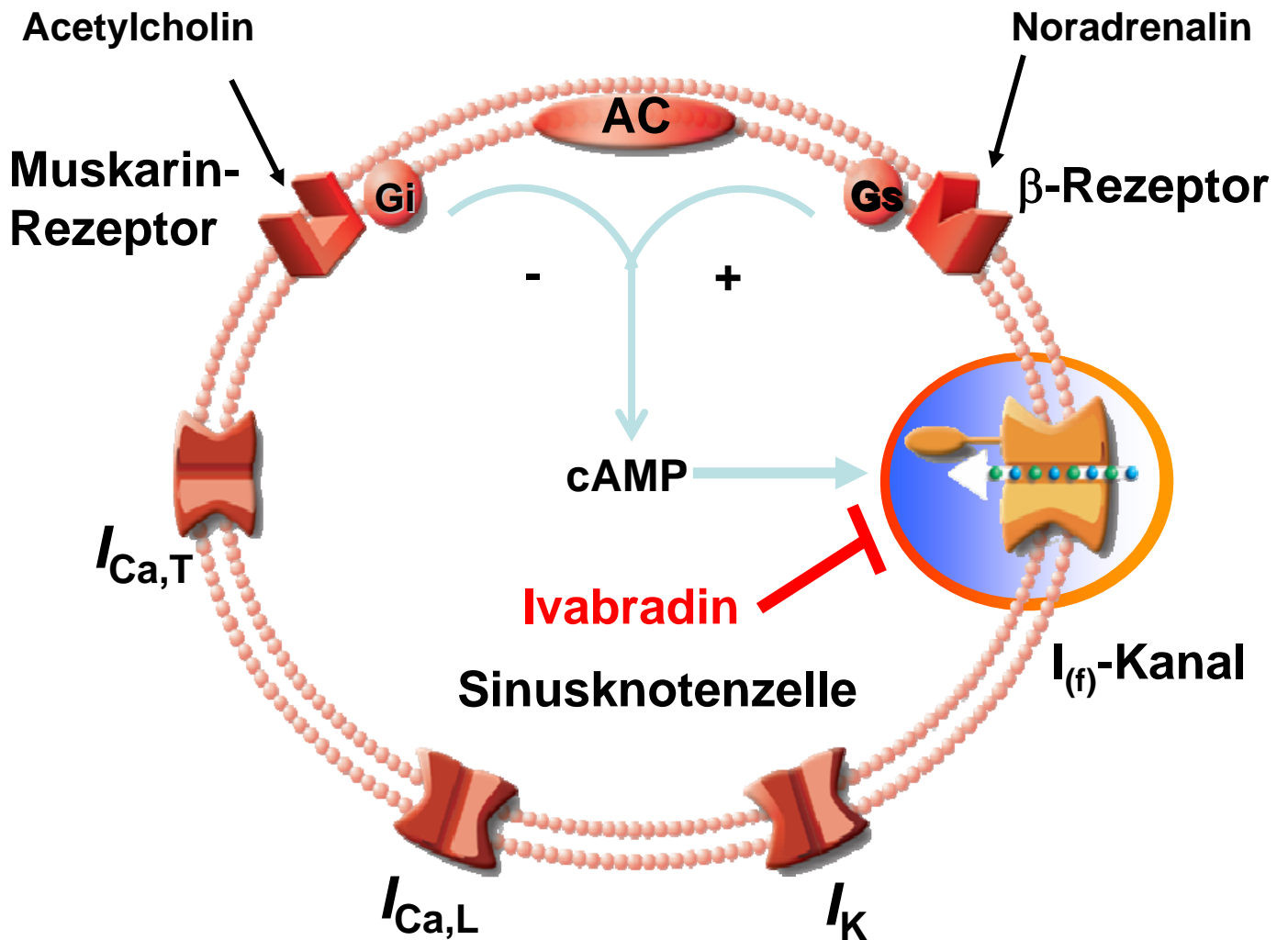


Abb. 2: Einflussmöglichkeiten des vegetativen Nervensystems auf den $I_{(f)}$ -Kanal einer Schrittmacherzelle. Durch sympathische Stimuli wird die Konzentration des cAMP intrazellulär erhöht, durch parasympathische Stimuli nimmt die Konzentration des cAMP ab. Zyklisches Adenosinmonophosphat bindet an das intrazelluläre Ende des $I_{(f)}$ -Kanals und erhöht dessen Öffnungswahrscheinlichkeit. Der $I_{(f)}$ -Kanal-Inhibitor Ivabradin bindet ebenfalls an die intrazelluläre Komponente des Kanals und blockiert den Kationeneinstrom.

durch Ivabradin nicht nennenswert beeinflusst. Die Substanz führt daher zu einer reinen Reduktion der Ruhe- und der Belastungsherzfrequenz, ohne dabei die Kontraktilität, die myokardiale Überleitungszeit und den Blutdruck zu beeinflussen^{49,50}.

Durch die über eine Reduktion der HF verlängerte Diastole führt Ivabradin zu einer Optimierung der myokardialen Blutversorgung. Vor diesem Hintergrund stellt diese pharmakologische Option vor allem für die Behandlung der stabilen Angina pectoris eine neue Behandlungsstrategie dar⁴¹. Klinische Studien lieferten den Nachweis einer effektiven antiischämischen und antianginösen Wirkung von Ivabradin⁵¹ und demonstrierten eine Gleichwertigkeit von Ivabradin bei der Behandlung der stabilen KHK im direkten Vergleich mit dem Betablocker Atenolol und dem Calciumantagonisten Amlodipin^{37,52}.

I_(f)-Kanal-Inhibition als Hilfsmittel zur Frequenzreduktion im Rahmen tierexperimenteller Forschung

Um die Rolle der Herzfrequenz und darüber hinaus die Bedeutung einer Herzfrequenzreduktion im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen zu untersuchen, standen bislang neben etablierten pharmakologischen Optionen (z.B. Betablocker) vor allem invasive Prozeduren wie Ablationstechniken oder eine Schrittmacherstimulation zur Verfügung. Diese unterliegen jedoch bedingt durch substanzspezifische Effekte bzw. durch ihren invasiven Charakter wesentlichen Limitationen, die eine breite experimentelle Anwendung entscheidend einschränken.

Durch I_(f)-Kanal-Inhibition mittels Ivabradin steht erstmalig eine pharmakologische Option zur Verfügung, mit der eine ausschließliche und selektive Reduktion der Herzfrequenz erreicht werden kann. Die einfache Applikation (Trinkwasser, Futterpellets) und das ausgesprochen geringe Nebenwirkungsprofil vereinfachen eine tierexperimentelle Anwendung der Substanz. Eine Vielzahl experimenteller Untersuchungen belegen eine verlässliche und reproduzierbare Frequenzreduktion bei verschiedenen Spezies. Daten von Du und Kollegen zeigen, dass eine orale Behandlung von Mäusen mit Ivabradin in Dosen ab 5 mg/kg/Tag zu einer signifikanten Reduktion der Herzfrequenz sowohl unter Ruhebedingungen als auch unter gesteigerter sympathoadrenerger Aktivität führt. Eine maximale Reduktion der Frequenz von bis zu 20% ist für Dosen von 10 mg/kg/Tag beschrieben⁵³. Auf diesen Daten basierend erfolgte die in der vorliegenden Arbeit

verwendete orale Applikation von Ivabradin mit einer täglichen Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht.

Die Frage nach potentiellen positiven Auswirkungen einer HF-Reduktion auf kardiovaskuläre Erkrankungen wurde bis heute anhand verschiedener tierexperimenteller Untersuchungen und Schadensmodelle untersucht. Diese umfassen vornehmlich Untersuchungen zur myokardialen Hämodynamik unter HF-Reduktion, beispielsweise in Infarktmodellen an der Ratte⁵⁴. Untersuchungen der Gefäßbiologie unter Einfluss einer HF-Reduktion mit Ivabradin, vor allem im Hinblick auf Endothelfunktion und Atherogenese, liegen bislang nicht vor.

2.6. Fragestellung

Epidemiologische und klinische Studien belegen eine relevante Assoziation zwischen der unter Ruhebedingungen gemessenen Herzfrequenz und kardiovaskulärer Sterblichkeit und weisen darauf hin, dass die Herzfrequenz direkte Wirkungen auf strukturelle und funktionelle Eigenschaften des Herz-Kreislauf-Systems hat. Experimentelle Untersuchungen weisen auf einen ursächlichen Zusammenhang zwischen Herzfrequenz und der Entstehung atherosklerotischer Gefäßerkrankungen hin. Die zugrunde liegenden molekularen und zellbiologischen Mechanismen und Effekte einer erhöhten Herzfrequenz auf vaskulärer Ebene sind bislang jedoch noch nicht oder nur unzureichend untersucht. Dies ist unter anderem durch die Schwierigkeit einer selektiven Herzfrequenzreduktion erklärt. Mit dem If-Kanal-Inhibitor Ivabradin steht eine Substanz zur Verfügung, mit der eine reine Reduktion der Herzfrequenz, ohne begleitende hämodynamische Effekte, erreicht werden kann.

Der Hypothese dieser Arbeit liegt die Annahme zugrunde, dass eine Herzfrequenzsenkung durch Ivabradin protektive vaskuläre Effekte vermittelt. Dies soll anhand des vaskulären Schadensmodells, der cholesterinreich gefütterten Apo E^{-/-}-Maus, untersucht werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung grundlegender Einflüsse einer reduzierten Herzfrequenz auf Endothelfunktion und Pathogenese der Atherosklerose. Im Sinne der Hypothese ergeben sich daher die folgenden Fragestellungen:

1. Welchen Effekt hat eine Herzfrequenzreduktion durch Ivabradin auf die endothelabhängige und die endothelunabhängige Vasorelaxation in cholesterinreich gefütterten ApoE^{-/-}-Mäusen?

Um diese Zusammenhänge zu untersuchen, erfolgte die Messung der Endothelfunktion an isolierten Gefäßringen des Aortenbogens im Organbad. Durch Applikation von Carbachol wurde die Bestimmung der endothelabhängigen Vasorelaxation durchgeführt, die anschließende Applikation von Glyceroltrinitrat diente der Messung der endothelunabhängigen Vasorelaxation.

2. Beeinflusst eine Herzfrequenzreduktion in ApoE^{-/-}-Mäusen die Entstehung und Ausprägung atherosklerotischer Plaques?

Hierzu wurde an Kryoschnitten der Aorta ascendens bzw. des Sinus aortae die Öl-Rot-Färbung durchgeführt, anhand derer die Quantifizierung der Plaquefläche softwaregestützt berechnet wurde.

3. Lassen sich Effekte auf die Morphologie und die Komposition der atherosklerotischen Läsionen durch Ivabradin nachweisen?

Hierfür erfolgten an Präparaten der Aorta ascendens und des Sinus aortae Färbungen der Makrophagen, des Kollagens sowie der glatten Muskelzellen, anhand derer die Plaquezusammensetzung charakterisiert und verglichen werden konnte.

4. Welchen Einfluss hat eine Frequenzreduktion auf vaskulären oxidativen Stress?

Hierfür erfolgte die Bestimmung der NADPH-Oxidase-Aktivität mittels Lucigenin-verstärkter Chemilumineszenz, die Bestimmung der vaskulären Superoxidproduktion durch chemilumineszente Messung des Farbstoffes L012 im aortalen Homogenat, die Bestimmung der Lipidperoxidation sowie die Färbung von reaktiven Sauerstoffspezies in Kryoschnittpräparaten der Aorta ascendens bzw. des Sinus aortae mittels Dihydroethidium (DHE).

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Material

3.1.1. Verwendete Substanzen

2-Propanol (Isopropanol), Merck, Darmstadt

Acetonitril, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA

Aprotinin, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA

Aquatex, Merck, Darmstadt

BHT (Butylhydroxytoluol), Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA

Calciumchlorid, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA

Carbachol, Merck, Darmstadt

Complete-Tablette, Roche Diagnostics, Mannheim

DAPI, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

Di-Kaliumhydrogenphosphat, Merck, Darmstadt

DHE (Dihydroethidium), Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

DMSO (Dimethylsulfoxid), Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA

Formalin, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA

Glukose, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA

Glyceroltrinitrat, Merck, Darmstadt

Igepal CA-630, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA

Kaliumchlorid, Merck, Darmstadt

Kaliumdihydrogenphosphat, Merck, Darmstadt

Ketamin, Pfizer Pharma, Karlsruhe

L-012, WAKO Chemicals, Neuss

L-NAME (Nitro-L-Argininmethylester), Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA

Leupeptin, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA

Lucigenin (N,N'-Dimethyl-9,9'-Biacridinium-Dinitrat), Fluka, Seelze

Magnesiumchlorid, Merck, Darmstadt

Methanol, Merck, Darmstadt

Mounting Medium, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA

Natriumchlorid, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA

Natriumfluorid, Merck, Darmstadt

Natrium-Hepes, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA

Natriumhydrogencarbonat, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA

Natriumhydrogenphosphat, Merck, Darmstadt

Natriumhydroxid, Merck, Darmstadt

Natriumorthovanadat (Na₃VO₄), Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA

Natriumpyrophosphat (Na₄P₂O₇), Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA

Nonidet P-40 (Nonylphenyl-polyethylenglycol), Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

Öl-Rot-O, Clin-Tech, Guildford, UK

Paraformaldehyd (PFA, reinst), Merck, Darmstadt

Phenylephrin, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA

Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF), Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA

Pikrinsäure (1,2%), Merck, Darmstadt

Sirius-Red-Lösung (0,1%), Polyscience Inc., Warrington, PA, USA

Tissue Freezing Medium (Einbettmedium), Fa. Jung, Nussloch

Tris-HCl, Carl Roth, Karlsruhe

Trishydroxymethyl-Aminomethan, VWR, Darmstadt

Xylazine, Bayer, Leverkusen

Xylol (reinst), Merck, Darmstadt

Ziegenserum (G9023), Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA

Verwendete Antikörper

Alexa Fluor 546 goat anti-rat IgG, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Monoclonal Anti- α -smooth-muscle-actin clone 1A4, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA

Rat anti mouse macrophages/ monocytes (MOMA-2, IgG2b), Serotec, Oxford, UK

Verwendete Kits

Lipidperoxidations-Assay-Kit II, Calbiochem, Cat. No. 437 634, Merck, Darmstadt

DC Protein Assay Reagent A, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

DC Protein Assay Reagent B, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

Verwendete Puffer & Lösungen

Wenn nicht anders angegeben, beziehen sich die Mengenangaben der Pufferbestandteile auf ein Endvolumen von 1000 ml.

1x PBS (phosphate buffered saline):	8,0 g NaCl 0,20 g KCl 0,24 g KH ₂ PO ₄ 1,44 g Na ₂ HPO ₄
Krebs-HEPES-Puffer	5,789 g NaCl 0,349 g KCl 0,275 g CaCl ₂ 0,296 g MgSO ₄ 5,206 g Na HEPES 0,179 g K ₂ HPO ₄ 2,1 g NaHCO ₃ 2,0 g Glukose
4% PFA	8,0 g Paraformaldehyd 100 ml Ampuwa 100 µl NaOH 100 ml 2xPBS
Tyrode	34,56 g NaCl 1,837 g CaCl ₂ 1,763 g KCl 0,571 g MgCl ₂ 0,816 g KH ₂ PO ₄ 10,50 g NaHCO ₃ 0,048 g EDTA 4,955 g Glucose In 5l Aqua dest., pH bei 7,4 ± 0,02
Kalium-Phosphat-Puffer	5,24 g KH ₂ PO ₄ 12,193 g K ₂ HPO ₄ 0,05 molare Lsg. mit Ampuwa herstellen 51,3 g Sucrose

Lysepuffer (240 ml)	4,8 ml Tris (1M), ph 7,4 2,4 ml EDTA (500mM) 24 ml Na ₄ P ₂ O ₇ (100mM) 120 ml NaF (200mM) 4,8 ml Na ₃ VO ₄ (100mM) 24 ml Nonidet P-40 (10%) 160 µl Aprotinin (10mg/ml) 160 µl Leupeptin (10mg/ml) 2,4 ml PMSF (100mM) 54,28 ml H ₂ O
----------------------------	--

3.1.2. Verwendete Tiere

Alle Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit der Tierschutzbeauftragten der Universität des Saarlandes Frau Dr. med. vet. Monika Frings sowie dem deutschen Tierschutzgesetz (BGBl. I S. 3001; 2008, 47) durchgeführt (Tierschutzantrag 25/2006, K110/180-07). Für die Untersuchungen wurden 12 Wochen alte, männliche C57/Bl6-Mäuse (Wildtyp (WT)) und männliche ApoE^{-/-}-Mäuse (ApoE^{-/-} B6.129P2-ApoE^{tm1Unc}/Crl, genetischer Hintergrund: C57/Bl6; Charles River, Sulzfeld, Germany) verwendet, welche im Tierstall des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie bei 22°C Raumtemperatur und einem 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus gehalten wurden. Trinkwasser und Futter standen den Tieren ad libitum zur Verfügung.

3.2. Methoden

3.2.1. Medikamentöse Behandlung der Versuchstiere

Im Rahmen der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente wurden insgesamt 10 Wildtyp- und 20 ApoE^{-/-}-Mäuse verwendet. Alle Tiere wurden ab einem Alter von 12 Wochen für insgesamt 6 Wochen mit einer fett- und cholesterinreichen Kost gefüttert, die

21% Fett, 19,5% Kasein und 1,25% Cholesterin enthielt (Western-type Diet, ssniff, Soest, Germany).

Nach randomisierter Zuordnung der ApoE-Mäuse wurden 10 ApoE-Tiere, zusätzlich zur oben genannten Nahrung mit Ivabradin behandelt (10 mg/kg/Tag). Ivabradin wurde in Form von Tabletten (Procoralan®, Servier, Frankreich) über die Klinikapotheke bezogen. Die Herstellung des Futters erfolgte durch die Firma ssniff (Soest, Deutschland). Bei der Berechnung der Behandlungsdosis wurde von einer täglichen Nahrungsaufnahme der Mäuse von 3 g/d ausgegangen. Dementsprechend enthielten die Futterpellets 0,2 mg Ivabradin um eine tägliche Dosierung von 10 mg/kg/d per os zu erreichen. Die Kontrollgruppe der ApoE-Tiere (n=10) sowie die Wildtypgruppe (n=10) erhielt wirkstofffreie Futterpellets.

Bestimmung von Plasmacholesterinwerten

Die Bestimmung der Plasmacholesterinwerte wie dem Gesamtcholesterin, den Triglyzeriden, sowie dem Low- und High-Density-Lipoprotein wurde mit chemischen Routinemethoden vom Zentrallabor der Universitätsklinik des Saarlandes (Gebäude 57) durchgeführt.

3.2.2. Messung von Blutdruck und Herzfrequenz

Zur nicht-invasiven Bestimmung des Blutdrucks (SBP, DBP) und der Herzfrequenz (HF) wurde der BP-2000 (series II, Visitech Systems, Apex, NC, USA) verwendet. Mit diesem Gerät, bestehend aus einer control unit, an die ein Laptop mit der BP-2000 Analyse Software sowie eine auf 37°C beheizbare Mäuseplattform angeschlossen waren, ist die simultane Messung von 4 Tieren möglich (**Abbildung 3**).

Hierzu wurde jede Maus in eine verdunkelte Box auf der vorgewärmten Platte gesetzt, eine Blutdruckmanschette am Schwanz angelegt und mit einem Infrarotsensor versehen. Vor der Randomisierung wurden die Tiere durch mehrfache Messungen an drei aufeinander folgenden Tagen an die Prozedur gewöhnt, bevor die offizielle Datenerhebung startete.



Abbildung 3: Messstation zur nicht-invasiven Blutdruck- und Herzfrequenzbestimmung bei Mäusen (BP-2000 series II, Abb. aus www.visitachsystems.com)

Während der Behandlungsphase erfolgte die Messung von Herzfrequenz und Blutdruck bei allen Mäusen jeden zweiten Tag, wobei eine Messung aus 20 Messdurchgängen bestand, aus denen für jedes Tier ein Durchschnittswert errechnet wurde.

3.2.3. Präparation der Tiere

Nach 6-wöchiger Behandlungsphase wurden die Mäuse mittels einer intraperitoneal applizierten Mischung aus Ketamin (50 mg/kg KG) und Xylazin (5 mg/kg KG, beides in 0,9% NaCl gelöst) getötet. Nun wurden die Tiere in Rückenlage fixiert und nach Befeuchtung des Thorax ein Hautschnitt in der Medianlinie vom Abdomen bis zum kranialen Ende des Sternums durchgeführt. Nach Eröffnung der Körperhöhlen wurde zunächst aus der Aorta abdominalis Blut entnommen und zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Mobilisation der Rippen, die Entnahme der Lungenpakete, die Darstellung der Aorta thoracalis sowie die Entfernung des Perikards. Mittels atraumatischer Pinzette und Präparierschere wurde die Aorta sorgfältig vom umliegenden Gewebe befreit, Herz und Aorta (pars thoracalis) exzidiert und sofort in kardiopleger Tyrode-Lösung gelagert, um Aortenringe für die Bestimmung der Endothelfunktion abzutrennen. Hierbei wurde streng darauf geachtet, dass das Gefäß weder verletzt, noch Zug- oder Druckbelastungen ausgesetzt wurde. Das verbleibende Herz

samt Aortenbogen wurde in Tissue Tec Freezing Medium eingebettet und zusammen mit den Serumproben bei -80°C gelagert.

3.2.4. Messung der Endothelfunktion

Die bei der Organentnahme gewonnenen ca. 3 mm dicken Ringe des Aortenbogens wurden direkt im Anschluss an die Organentnahme in der o.g. Tyrodelösung zur Messanlage transportiert. Nun wurden die Segmente zwischen zwei Häkchen gespannt und in ein 37°C warmes Organbad mit Tyrode gehängt, welches kontinuierlich mit 95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxid begast wurde. Die von den Aortenpräparaten entwickelte isometrische Kontraktionskraft wurde über einen induktiven Kraftaufnehmer (Fa. Fleck, Mainz, Deutschland) gemessen und mit einem Schreiber (Gould 2400 4-Kanal-Schreiber, Fa. FMI, Seeheim, Deutschland) durchgängig registriert. Nun wurden die Gefäßsegmente über 60 Minuten schrittweise bis zu einer Ruhespannung von 10 mN gedehnt, die während des Experiments beibehalten wurde. Im Folgenden wurden nacheinander verschiedene vasoaktive Substanzen in unterschiedlichen Konzentrationen in die Organbäder gegeben, wobei die Reaktion des Gewebes bis zum Erreichen eines Plateauwertes abgewartet wurde bevor mit der nächsthöheren Dosierung weitergearbeitet wurde. Begonnen wurde mit Kaliumchlorid, einem Vasokonstriktor, wobei die Aortensegmente zunächst mit einer 20 millimolaren Lösung inkubiert wurden. Nach Stabilisierung der Gefäßkontraktion und Detektion der Werte wurde die KCl-Konzentration auf 40 mmol/l erhöht. Hiernach wurden zum vollständigen Entfernen aller KCl-Rückstände die Organbäder drei Mal mit Tyrode gespült, bevor im nächsten Versuchsteil ein potenterer Vasokonstriktor, Phenylephrin, in aufsteigender Dosierung (jeweils $\times 10$) verwendet (1 nmol/l bis 100 $\mu\text{mol/l}$) wurde. Nun wurde parasymphomimetisches und somit vasorelaxierend wirkendes Carbachol in aufsteigender Dosierungsreihe eingesetzt (1 nmol/l bis 100 $\mu\text{mol/l}$). Der dilatierende Effekt des Carbachols wurde im nächsten Schritt mit dem NO-Synthasehemmer L-NAME (1 $\mu\text{mol/l}$) aufgehoben. Nach erneutem Spülen der Organbäder mit Tyrode wurde die endothelunabhängige Vasorelaxation mittels Glyceroltrinitrat (1 nmol/l bis 10 $\mu\text{mol/l}$) gemessen. Alle Verdünnungsreihen der verwendeten Substanzen wurden in H_2O angefertigt.

3.2.5. Kryoschnitte von Aorta und Herz

Das in Tissue Freezing Medium eingebettete Herz samt Aorta ascendens wurde mit einem Kryostat (CM 1900, Leica, Wetzlar) in 10 µm dicke Segmente geschnitten, wobei optimale Ergebnisse bei einer Temperatur von -20°C in der Kryostatkammer, sowie einem auf -30°C gekühlten Probentisch erzielt wurden. Die Proben wurden so in den Vorschubmechanismus eingespannt, dass die Schnitte von der Aorta beginnend in Richtung Klappenebene des Herzens erfolgten. Durch die Bedienung der Handkurbel wurde der Vorschubmechanismus in Gang gesetzt, wodurch der Objekthalter gegen eine Klinge (Typ S35, Feather, Osaka, Japan) abgesenkt wurde und der hierbei entstandene Schnitt auf dem Probentisch zu liegen kam. Maximal sechs dieser Schnitte wurden auf einem Polysine-beschichteten Objektträger (Menzel, Braunschweig) aufgenommen, pro Tier wurden mindestens 25 Objektträger angefertigt. Bis zur weiteren Verarbeitung der Schnitte wurden diese bei -80°C gelagert.

3.2.6. Färbungen und Immunhistochemie

3.2.6.1. Öl-Rot-Färbung

Zur Darstellung von Lipiden in Kryoschnittpräparaten der Aorta ascendens sowie des Sinus aortae und anschließender Quantifizierung der Fläche der atherosklerotischen Läsionen wurde die Öl-Rot-Färbung verwendet. Der Farbstoff besitzt eine hohe Affinität zu Fetten, diffundiert in die Gewebe hinein und färbt Lipide rot. Alle anderen Strukturen wie Zellplasma, Mitochondrien und Zellkerne bleiben ungefärbt.

Zum Ansetzen der Stammlösung wurden 500 mg des Farbstoffes Öl-Rot in 100 ml 99% Isopropanol gelöst. Für die Gebrauchslösung wurden dann 6 Teile der Stammlösung mit 4 Teilen Aqua dest gemischt und im Anschluss 24 Stunden stehen gelassen. Vor Gebrauch wurde die Lösung filtriert.

Die luftgetrockneten Gefrierschnitte wurden nach folgendem Protokoll behandelt:

- | | |
|------------------------|----------|
| 1. 4 % Formalin | 1 Stunde |
| 2. Spülen in Aqua dest | 3 mal |

3. Färben in Ölrot 30 min
4. Spülen in Aqua dest 3 mal
5. Eindecken mit Aquatex (Deckgläser: 24 x 50mm, VWR international, Darmstadt)
6. Trocknung

Die Auswertung der Färbepreparate erfolgte lichtmikroskopisch unter gleichen Belichtungs- und Vergrößerungseinstellung für beide Behandlungsgruppen.

3.2.6.2. Sirius-Red-Färbung

Zur Darstellung und Quantifizierung von Kollagen und extraretikulären Fasern in Kryoschnitten der Aorta ascendens sowie des Sinus aortae wurde die Sirius-Red-Färbung durchgeführt. Der Farbstoff lagert sich gezielt an die oben genannten Strukturen an und färbt diese rot.

Zur Herstellung der Gebrauchslösung wurden 12 g Pikrinsäure unter starkem Rühren in 1000 ml Aqua dest gelöst. Zu 500 ml dieser Pikrinsäurelösung wurden 0,5 g Sirius-Red-Lösung hinzugefügt und abermals kräftig gerührt. Die nun entstandene Lösung musste bei Raumtemperatur eine Woche reifen.

Die Verdünnung des Isopropanols erfolgte mittels Aqua dest.

Die luftgetrockneten Gefrierschnitte wurden nach folgendem Protokoll behandelt:

1. 100% Propanol 2 min
2. 90% Propanol 2 min
3. 70% Propanol 2 min
4. Aqua dest 5 min
5. Aqua dest 10 min
6. 0,1% Sirius-Red-Lösung 15 min
7. Aqua dest kurz spülen
8. 90% Propanol 2 min

- | | |
|-----------------------------|-------|
| 9. 100% Propanol | 2 min |
| 10. Xylol | 2 min |
| 11. Eindecken mit Entellan | |
| 12. Trocknung (unter Abzug) | |

Die Auswertung der Färbepreparate erfolgte lichtmikroskopisch unter gleichen Belichtungs- und Vergrößerungseinstellung für beide Behandlungsgruppen.

3.2.6.3. Immunfluoreszenzfärbung von Makrophagen

Im Rahmen der Atherogenese kommt es zur Einwanderung von Makrophagen in die Gefäßwand (siehe Kapitel 2.3.). Durch antikörpervermittelte Immunfluoreszenzfärbung ist die Darstellung und Quantifizierung der in die Gefäßwand eingewanderten Monozyten und Makrophagen möglich.

Hierzu wurden die Gefrierschnittpräparate der Aorta ascendens und des Sinus aortae zunächst mit einem spezifisch an Makrophagen bzw. Monozyten bindenden Primärantikörper (Rat anti mouse MOMA, 1:50 mit Ziegenserum verdünnt) inkubiert. In einem zweiten Schritt erfolgte die Inkubation mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Sekundärantikörper (Alexa Fluor anti rat, 1:200 mit Ziegenserum verdünnt), der mit dem Primärantikörper eine spezifische Bindung einging. Nach dieser immunologischen Färbung konnten Makrophagen und Monozyten mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops (Nikon Eclipse E 600 mit super-high-pressure-mercury-Lampe, Mikroskopkamera: Nikon Digital Kamera DXM 1200F) sichtbar gemacht werden.

Um Verfälschungen der Ergebnisse auszuschließen, wurde auf streng identische Belichtungseinstellungen geachtet. Desweiteren wurde in jedem Versuch eine Negativkontrolle durchgeführt, bei der alle Antikörperlösungen durch Ziegenserum ersetzt wurden. Diese blieben während der gesamten Versuchsreihe negativ.

Die luftgetrockneten Gefrierschnitte wurden nach folgendem Protokoll behandelt:

- | | |
|-----------|-------|
| 1. 4% PFA | 2 min |
| 2. 1xPBS | 5 min |

3. 0,5% Igepal 10 min (Igepal mit 1xPBS verdünnt)
4. 0,5% Ziegenserum 30 min (Ziegenserum mit 1xPBS verdünnt)
5. Primärantikörper 3 h
6. 1xPBS 3x5 min waschen
7. Sekundärantikörper 60 min (in feuchter Dunkelkammer)
8. 1xPBS 3x10 min waschen
9. Eindecken mit Mounting Medium und DAPI
10. Lagerung im Kühlraum (lichtgeschützt)

3.2.6.4. Immunfluoreszenzfärbung von Alpha-Aktin

Im Rahmen der Atherogenese kommt es zu einer Einwanderung und Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen (vSMC) in die atherosklerotische Läsion (s. Kap. 2.3.) Durch antikörpervermittelte Immunfluoreszenzfärbung ist die Darstellung und Quantifizierung von glatten Muskelzellen in den Gefäßpräparaten möglich.

Der verwendete Antikörper (Monoclonal Anti- α -smooth-muscle-actin) bindet spezifisch an das Strukturprotein α -Aktin der glatten Muskelzellen und ist bereits mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert gewesen, so dass sich die Anwendung eines Sekundärantikörpers erübrigte. Auch hier erfolgte das Mikroskopieren und Abfotografieren unter gleichen Bedingungen für alle Gruppen. Die Negativkontrolle blieb während der gesamten Versuchsreihe negativ.

Die luftgetrockneten Gefrierschnitte wurden nach folgendem Protokoll behandelt:

1. 4% PFA 2 min
2. 1xPBS 5 min
3. 0,5% Igepal 10 min (Igepal mit 1xPBS verdünnt)
4. 0,5% Ziegenserum 30 min (Ziegenserum mit 1xPBS verdünnt)
5. Primärantikörper 3 h (in feuchter Dunkelkammer)

6. 1xPBS 3x5 min
7. Eindecken mit Mounting Medium und DAPI
8. Lagerung im Kühlraum (lichtgeschützt)

3.2.7. Auswertung der Atherosklerose

3.2.7.1. Morphometrie

Um das Ausmaß der atherosklerotischen Läsionen objektiv beurteilen zu können, wurden die Plaueflächen in der Aortenklappenebene sowie in der Aorta ascendens vermessen. Hierzu wurden Präparate nach Öl-Rot-Färbung verwendet, da die Läsionen vom umgebenden Gewebe sehr gut abgrenzbar sind.

Desweiteren wurde darauf geachtet, dass nur korrekte Schnittebenen verwendet wurden, d.h. alle drei Klappen mussten gut sichtbar und die Lumina geöffnet sein. Nun wurden die fixierten Objektträger bei 4-facher Vergrößerung (Übersichtsaufnahme) lichtmikroskopiert und mittels der im Mikroskop eingebauten Digitalkamera abfotografiert. Die Bestimmung der Plauefläche erfolgte verblindet mit Hilfe der Lucia G-Software (Nikon, Düsseldorf). Nach Markierung des Endothels und der atherosklerotischen Läsion wurden die Rohdaten in eine Excel-Datei exportiert und die Lumen- und Plauefläche nach folgender Formel berechnet wurden: $(\text{Plauefläche} * 100) / \text{Lumenfläche}$.

3.2.7.2. Histologische Charakterisierung atherosklerotischer Plaques

Um die Zusammensetzung der Plaques zu charakterisieren, wurde nach Sukhova et al. eine 4-stufige Graduierung der einzelnen Färbungen angelegt. Hierzu wurde jede einzelne Läsion verblindet beurteilt und die jeweilige Färbung nach folgendem Schema eingeteilt ⁵⁵:

+	Keine positive Reaktion auf Färbung
++	leicht positive Reaktion, inhomogene Verteilung der Färbung innerhalb der Läsion
+++	positive Reaktion, homogene Verteilung
++++	gesamter Plaque positiv

Bei der Auswertung der Alpha-Aktin-Färbungen wurde hingegen nicht die gesamte Plaquefläche, sondern die Plaquekappe im Speziellen beurteilt. Ausschlaggebend für die Auswertung der Zusammensetzung der Läsionen war der Mittelwert aller Präparate einer Färbung.

3.2.8. Quantifizierung von vaskulärem oxidativen Stress

3.2.8.1. Messung der Lipidperoxidation (LPO)

Freie Sauerstoffradikale führen zur Lipidperoxidation. Diese kann als ein globaler Marker für vaskulären oxidativen Stress bestimmt werden. Lipidperoxide und ihre Nebenprodukte führen zu einem Verlust der zellulären Membranintegrität. Malondialdehyd (MDA) und 4-Hydroxyalkenale sind Endprodukte der Peroxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren. Ihre Messung dient als Index für das Ausmaß der Lipidperoxidation. Die Entstehung von MDA wird in der Bestimmung der LPO ausgenutzt, indem jeweils zwei Moleküle des chromogenen N-Methyl-2-Phenylindol (Reagenz 1 des Kits, in Azetonitril gelöst) mit einem Molekül MDA kondensieren und somit einen stabilen Chromophoren mit einer maximalen Absorption bei 586 nm bilden, der photometrisch bestimmt werden kann.

Zunächst wurden die Aortenproben gewogen, homogenisiert (in 20 mmol Tris-HCL, 5 mmol BHT, pH 7,4), bei 4°C für 10 min zentrifugiert (3000g) und der Überstand in Eppendorfgefäße pipettiert. Nach Erstellen einer Standard-Verdünnungsreihe (Endkonzentrationen 0; 0,5; 1; 2; 3; 4 µmol MDA) wurde nun auf jede Probe 650 µl verdünntes Arbeitsreagenz 1 (18 ml N-Methyl-2-Phenylindol und 6 ml Methanol) pipettiert, kurz gevortext und 150 µl Arbeitsreagenz 2 (Methansulfonsäure) hinzugegeben. Im Anschluss wurden die Eppendorfgefäße bei 45°C für eine Stunde im Wasserbad inkubiert und abermals 10 min bei 15000g zentrifugiert. Aus dem entstandenen Überstand wurden bei einer Wellenlänge von 586 nm die Extinktionen photometrisch bestimmt.

Nun erfolgte die Proteinbestimmung des Lysates aus Gewebstücken nach der Methode von Lowry et al., eine der Biuret-Methode verwandte, kalorimetrische Methode⁵⁶.

Zunächst wurde die Proteinprobe in 1µl des Lysepuffers gegeben und im Verhältnis 1:20 mit Ampuwa verdünnt. Durch Zugabe von 100µl D_c Protein Assay Reagent A wurde ein Kupfer-Protein-Komplex in alkalischer Lösung gebildet. Dieser Komplex wurde anschließend durch 800µl zugegebenes Phosphomolybdat-Phosphowolfram-Reagens (D_c Protein Assay Reagent B) reduziert. Während der Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur färbte sich die Lösung in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration bläulich. Die Extinktion der Lösung wurde bei 540 nm photometrisch gemessen (Spectrophotometer DU 730, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), um dann die daraus resultierende Proteinkonzentration zu berechnen. Als Standard-Proteinlösung diente Rinderserumalbumin in einem Konzentrationsbereich von 100 - 1000 µg/ml. In einem letzten Schritt wurde nun die MDA-Konzentration in µmol pro µg Protein berechnet.

3.2.8.2. Messung der vaskulären Superoxidproduktion (L012-Messung)

Die Bestimmung der zellulären Bildung bzw. Freisetzung von Superoxidanionen erfolgte mit Hilfe der Chemilumineszenz. Dabei wurde der Chemilumineszenz-Farbstoff L012, der mit einer hohen Spezifität und Sensitivität Superoxidanionen nachweisen kann, verwendet.

Zunächst wurden 2mm lange, fettfrei präparierte Aortensegmente in Krebs-Hepes-Puffer deponiert. Die Gebrauchslösung (100 mM L012 in DMSO) wurde mit PBS verdünnt (1:100), mit dem Krebs-Hepes-Puffer (1:10, Endkonzentration 100 µM) vermischt und schließlich zusammen mit dem Aortenring in ein Messröhrchen des Luminometers gegeben. Bei der

folgenden Reaktion wurden über 15 Minuten lang (Zeitintervall 1 Minute) emittierte Photonen pro mg Aortengewicht und Zeiteinheit (relative light units/mg/min) bei einer Wellenlänge von 550 nm mittels Luminometer (Lumat LB 9507, Berthold Technologies GmbH, Bad Wildbad) gemessen. Schließlich wurde das Feuchtgewicht der Aortensegmente bestimmt.

3.2.8.3. Fluoreszenzfärbung mit Dihydroethidium (DHE)

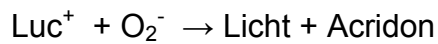
Die DHE-Färbung ermöglicht es, reaktive Sauerstoffspezies in situ mikroskopisch nachzuweisen, da Dihydroethidium in Anwesenheit von Superoxidanionen ($\bullet\text{O}_2^-$) zu Ethidium oxidiert. Dieses Ethidium fluoresziert im UV-Lichtbereich rot und kann mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden.

Für die Färbung wurde zunächst das DHE in DMSO gelöst (2 mM) und anschließend mit dem Krebs-Hepes-Puffer verdünnt (2 $\mu\text{mol/l}$).

Die Gefrierschnittpräparate von Aorta ascendens und Sinusebene beider Behandlungsgruppen wurden nun 30 Minuten lang bei 37°C in einer abgedunkelten Feuchtkammer mit dieser Färbelösung inkubiert. Anschließend erfolgte aufgrund mangelnder Haltbarkeit der Färbung die Visualisierung der ROS in situ mittels Fluoreszenzmikroskops (s. 3.2.6.3.). Die Datenerfassung wurde unter streng identischen Bedingungen für beide Behandlungsgruppen durchgeführt, im Anschluss erfolgte die digitale Aufbewahrung (Software: ImageJ 1.37v by W. Rasband, National Institute of Health, USA).

3.2.8.4. Messung der NADPH-Oxidase-Aktivität

Die NADPH-Oxidase ist ein Multienzymkomplex, der im menschlichen Organismus als einer der wichtigsten Produzenten von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) angesehen wird. Mittels Lucigenin-verstärkter Chemilumineszenz ist es möglich, die Aktivität dieses Enzymkomplexes zu bestimmen, da bei der Reaktion eines Lucigenin-Radikals mit dem Superoxidradikal angeregtes Acridon entsteht, welches beim Rückfall in den Ruhezustand Licht emittiert^{57,58}.



Hierzu wurden die Gewebeproben in Kalium-Phosphat-Puffer mit einer EDTA-freien Complete Tablette (Proteasen-Inhibition) bei 4°C gepottert und für eine Minute ins Ultraschallbad gelegt. Die Reaktion konnte durch Zugabe von 500µl Lucigenin (0,005 mmol/l, auf 37° C erwärmt) sowie 100µl NADPH (1 mmol/l, auf 37° C erwärmt) zu jeweils 250µl Probe gestartet werden, wobei die entstandenen Photonen mit Hilfe eines Luminometer (Lumat LB 9507, Berthold Technologies GmbH, Bad Wildbad) über 10 Minuten in 1-minütigen Intervallen gezählt wurden (Einheit: RLU/s = relative light units/second). Parallel hierzu wurde eine Proteinbestimmung nach Lowry durchgeführt⁵⁶ (siehe auch Kapitel 3.2.8. Messung der Lipidperoxidase), um die gemessenen RLU/s pro µg Protein zu erhalten.

3.2.9. Statistische Auswertung

Die angegebenen Daten wurden als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Statistische Signifikanz wurde mittels t-Test für 2 Stichproben, sowie mittels ANOVA-Test gefolgt von Newman Keuls post hoc-Analysen bestimmt. Statistische Signifikanz wurde für $p < 0,05$ angenommen.

4. ERGEBNISSE

4.1. Die Wirkung von $I_{(f)}$ -Kanal-Inhibition auf Herzfrequenz, Blutdruck und Lipidwerte von Wildtyp- bzw. ApoE^{-/-}-Mäusen

Vorrangiges Ziel der im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewählten medikamentösen Behandlung mit dem $I_{(f)}$ -Kanal-Hemmer Ivabradin war eine relevante Senkung der unter Ruhebedingungen gemessenen Herzfrequenz von cholesterinreich gefütterten ApoE^{-/-}-Mäusen. 12-Wochen alte ApoE^{-/-}-Mäuse (n=10) wurden über einen Zeitraum von insgesamt 6 Wochen mit Ivabradin behandelt. Bezüglich des Körpergewichts unterschieden sich Verum- und Placebo-behandelte ApoE-Mäuse nicht (33,7±1 g vs. 33,9±0,5 g). Die Behandlung mit Ivabradin (10 mg/kg/Tag) führte zu einer signifikanten Senkung der mittleren Herzfrequenz um 13±2% (-72±2 bpm) im Vergleich zu unbehandelten ApoE-Mäusen (n=10) (ApoE Iva: 472±9 vs ApoE Placebo: 545±11 bpm; p<0.01) (**Tabelle 1**). Die Reduktion der Herzfrequenz blieb über die gesamte Dauer der Behandlung konstant erhalten (**Abbildung 4 A,B**). Die mittlere Herzfrequenz der unbehandelten Wildtypmäuse lag mit 608±14 Schlägen signifikant über der Frequenz der ApoE-Placebo-Tiere (p<0,01). Die Behandlung mit Ivabradin beeinflusste weder die systolischen noch die diastolischen Blutdruckwerte. Durch cholesterinreiche Fütterung kam es in den ApoE-Mäusen, im Gegensatz zu den Wildtypmäusen, zu einer deutlichen Erhöhung des Gesamtcholesterins sowie des LDL-Cholesterins (**Tabelle 1**).

4.2. Die Herzfrequenzreduktion durch Ivabradin verbessert die endothelabhängige Vasorelaxation in cholesterinreich gefütterten ApoE-defizienten Mäusen

Unter physiologischen Bedingungen stellt die endothelabhängige Vasodilatation die wesentliche Grundvoraussetzung für die vaskuläre Integrität dar. Ein dysfunktionales Gefäßendothel ist im Wesentlichen durch eine Einschränkung der endothelabhängigen

Tabelle 1:

	Wildtyp	ApoE^{-/-} Placebo	ApoE^{-/-} Ivabradin
Herzfrequenz, bpm	608±14	545±11*	472±9**
SBP, mmHg	116±3	109±3	117±2
DBP, mmHg	82±8	84±8	89±6
Gesamtcholesterin, mg/dl	149±15	1430±138†	1342±14†
LDL-Cholesterin, mg/dl	16±2	889±79†	955±17†
HDL-Cholesterin, mg/dl	120±14	524±107*	323±51‡
Triglyzeride, mg/dl	75±10	108±15	76±18

Tabelle 1 : Mittelwerte Herzfrequenz, systolischer Blutdruck (SBP), diastolischer Blutdruck (DBP), Gesamtcholesterin, LDL-Cholesterin (Low-Density-Lipoprotein), HDL-Cholesterin (High-Density-Lipoprotein) und Triglyzeride in Wildtyp- (WT) und ApoE^{-/-}-Mäusen mit cholesterinreicher Fütterung (Western Type Diet).
Behandlung der ApoE^{-/-}-Tiere mit Ivabradin (10 mg/kg Körpergewicht pro Tag, per os) oder Placebo für 6 Wochen.
(mean±SEM; n=10 pro Gruppe; *p<0,01 vs WT, **p<0,01 vs ApoE^{-/-}-Placebo, †p<0,001 vs WT, ‡p<0,05 vs ApoE^{-/-}-Placebo).

Abbildung 4:

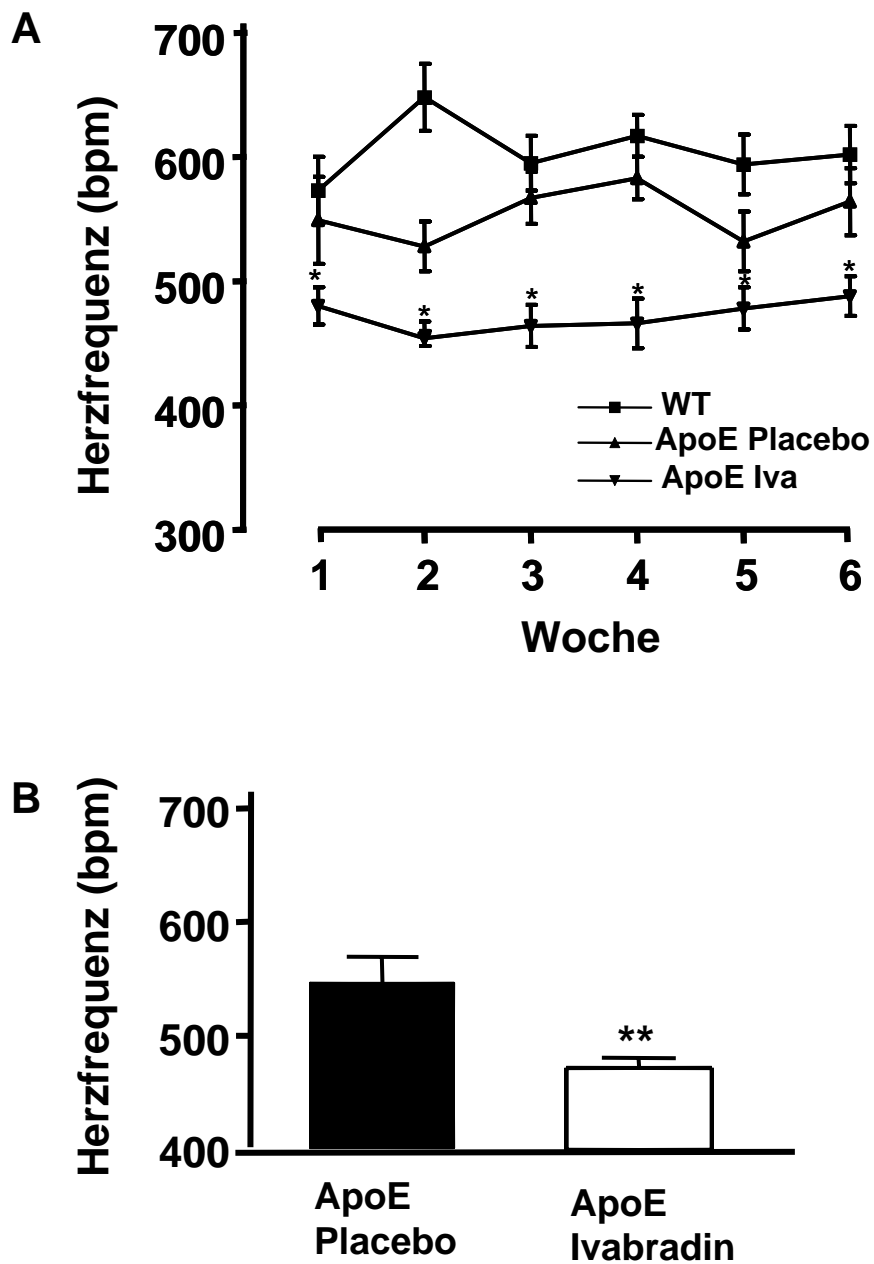


Abb. 4: Effekt von 6-wöchiger Ivabradinbehandlung (10 mg/kg KG/d p.o.) auf die Herzfrequenz in ApoE^{-/-}-Mäusen auf Western Type Diet verglichen mit Wildtyp-Kontrollen (A: HF im 6-wöchigen Verlauf, B: Mittelwert der HF, mean±SEM, n=10 pro Gruppe, * $p < 0,01$ vs ApoE^{-/-}-Placebo, ** $p < 0,01$ vs ApoE^{-/-}-Placebo).

Vasodilatation gekennzeichnet und stellt den initialen Schritt im Rahmen der Atherogenese dar³⁻⁵.

Eine etablierte Methode zur Untersuchung der Endothelfunktion im Tiermodell ist die Untersuchung von isolierten Gefäßringen im Organbad. Hierbei wird die isometrische Kontraktion des Gefäßrings nach Applikation vasokonstriktiver und vasorelaxierender Substanzen gemessen. Ein wesentliches Maß für die endothelabhängige Vasorelaxation stellt die Relaxation des Gefäßringes nach Applikation von Carbachol dar⁹. Die endothelunabhängige Relaxation des Gefäßringes wird nach Applikation von Glyceroltrinitrat gemessen.

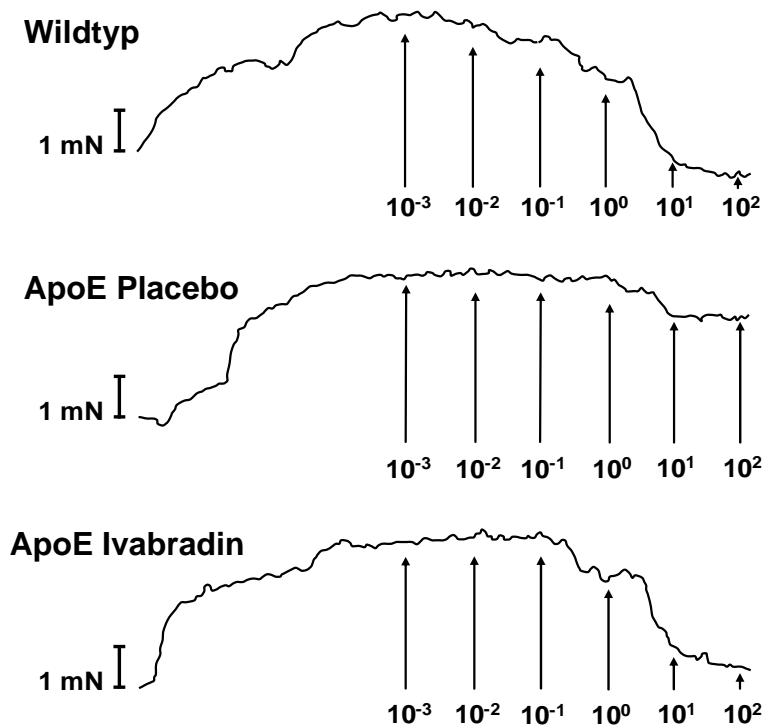
Aortenringe der cholesterinreich gefütterten ApoE-Mäuse wiesen nach Applikation von Carbachol im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine deutlich verminderte Relaxation auf. Reduktion der Herzfrequenz mit Ivabradin führte zu einer signifikanten Verbesserung der Relaxation im Vergleich zu den Placebo behandelten ApoE-Mäusen ($p < 0,05$). Das Ausmaß der Relaxation unter Frequenzreduktion näherte sich hierbei nahezu dem Niveau der Wildtypkontrollen an (**Abbildung 5 A,B**). Hinsichtlich der Glyceroltrinitrat induzierten, primär endothelunabhängigen Vasodilatation, zeigte sich kein Unterschied zwischen den drei Gruppen (**Abbildung 6**).

4.3. Die Reduktion der Herzfrequenz durch Ivabradin reduziert das Ausmaß atherosklerotischer Läsionen in ApoE^{-/-}-Mäusen

Im Rahmen histomorphometrischer Untersuchungen erfolgte mittels Öl-Rot-Färbungen eine Quantifizierung der Fläche atherosklerotischer Plaques im Sinus aortae auf Höhe der Klappenebene und in der Aorta ascendens. Die Reduktion der Herzfrequenz durch Ivabradin führte zu einer signifikanten Abnahme der Plaquefläche, sowohl im Aortensinus als auch in der Aorta ascendens im Vergleich zu den Placebo behandelten ApoE-Tieren. ApoE-defiziente Mäuse mit physiologischer Herzfrequenz ($n=10$) wiesen eine Plaquefläche von $32 \pm 4\%$ auf. Die Plaquefläche in der Aortenwurzel Ivabradin behandelter Mäuse ($n=10$) betrug $18 \pm 2\%$, was einer Reduktion um 40% entspricht ($p < 0,05$). In der Aorta ascendens betrug die Fläche in der Gruppe der Placebo behandelten Tiere $26 \pm 4\%$. Unter Behandlung

Abbildung 5:

A



B

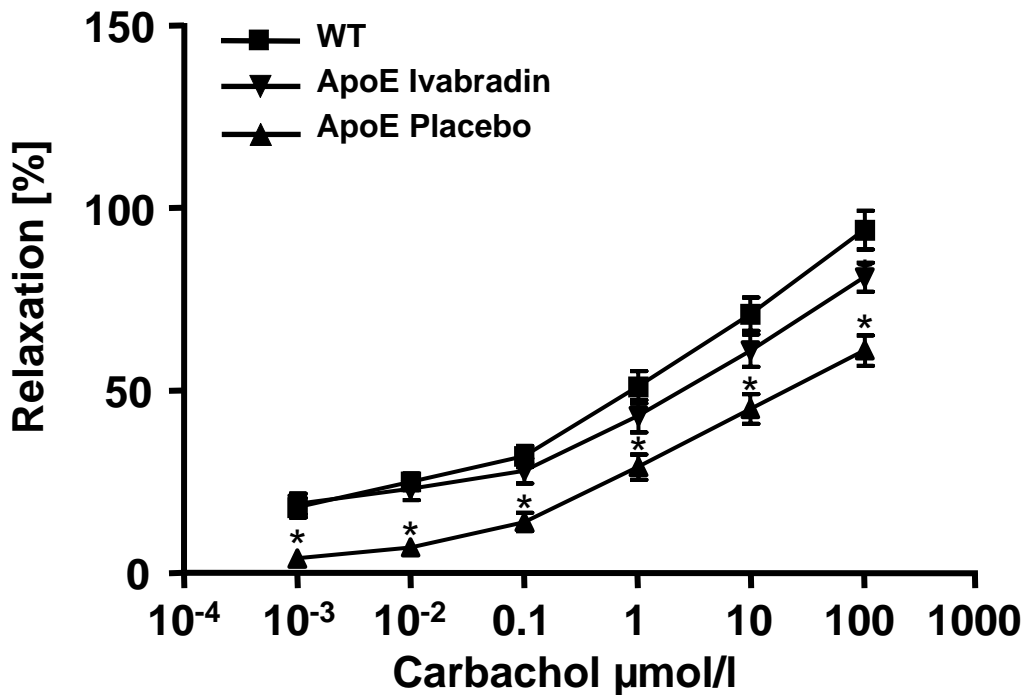


Abb. 5: Carbachol induzierte endothelabhängige Vasorelaxation von Aortenringen (A,B), alle Angaben in Prozent der maximalen Phenylephrin induzierten Vasokonstriktion bei ApoE^{-/-}-Mäusen auf Western Type Diet, behandelt mit Ivabradin (10 mg/kg KG/d, p.o.) oder Placebo für 6 Wochen (mean \pm SEM, n=10 pro Gruppe, * $p < 0,05$ vs ApoE^{-/-}-Placebo).

Abbildung 6:

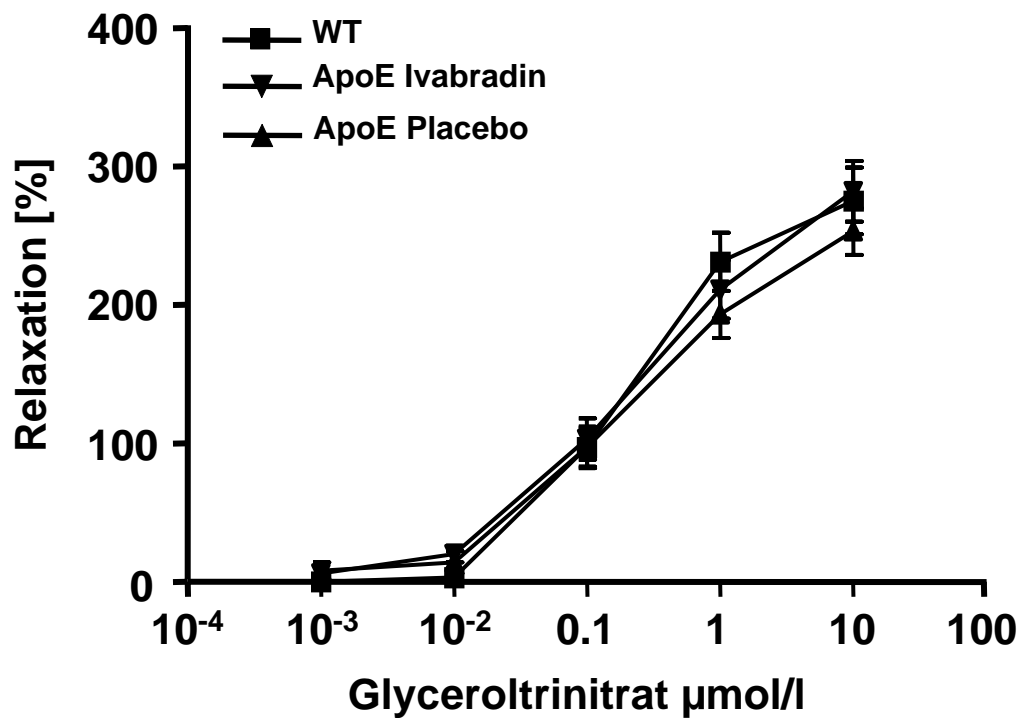


Abb. 6: Glyceroltrinitrat induzierte endothelunabhängige Vasorelaxation, alle Angaben in Prozent der maximalen Phenylephrin induzierten Vasokonstriktion bei ApoE^{-/-}-Mäusen auf Western Type Diet, behandelt mit Ivabradin (10 mg/kg KG/d, p.o.) oder Placebo für 6 Wochen (mean \pm SEM, n=10 pro Gruppe, * p <0,05 vs ApoE^{-/-}-Placebo).

mit Ivabradin war das Ausmaß der Plaques mit $7\pm 1\%$ wesentlich geringer. Insgesamt entspricht dies einer Reduktion um 70% ($p < 0,05$, **Abbildung 7 C+F**).

4.4. Die Reduktion der Herzfrequenz durch Ivabradin beeinflusst die Plaquemorphologie in ApoE^{-/-}-Mäusen

Die Entwicklung einer atherosklerotischen Läsion ist unter anderem durch die Einwanderung von Monozyten und Makrophagen, glatten Gefäßmuskelzellen und Kollagen in die Gefäßwand gekennzeichnet.

Durch spezifische Färbungen erfolgte über die Erfassung der Ausdehnung der atherosklerotischen Plaques hinaus auch eine Charakterisierung der Plaquezusammensetzung durch den Nachweis der für die Plaquemorphologie wesentlichen oben genannten Bestandteile.

Durch die Alpha-Aktin-Färbung wurden glatte Muskelzellen dargestellt, die vorrangig in den Plaquekappen atherosklerotischer Läsionen zu finden sind. In den Plaquekappen der Placebo gefütterten Tiere zeigte sich eine stärkere Proliferation der glatten Muskelzellen als in den Ivabradin gefütterten ApoE-Mäusen (Placebo +++ vs. Ivabradin ++, Alpha-Aktin-Färbung, **Abbildung 8 A-C**). Da die vSMC zur Stabilität einer Plaque beitragen, spricht dieser Befund für eine etwas stabilere Zusammensetzung der Läsionen in den Placebo gefütterten ApoE-Tieren.

Durch die Makrophagen-Färbung konnte die Einwanderung von Makrophagen in die atherosklerotische Plaque bestimmt werden. Dies ergab in beiden Versuchsgruppen eine vergleichbar hohe und die gesamte Läsionsfläche betreffende Durchsetzung mit Entzündungszellen (Placebo +++ vs. Ivabradin +++, **Abbildung 8 D-F**). Im Hinblick auf das entzündliche Geschehen innerhalb der Läsionen, welches u.a. durch die Produktion von Matrixmetalloproteasen zur Destruktion der Plaquekappen und somit zur Instabilität der gesamten Läsion beitragen kann, wurde hier kein Unterschied zwischen Placebo und Ivabradin gefütterten ApoE-Tieren gefunden.

Abbildung 7:

Öl-Rot

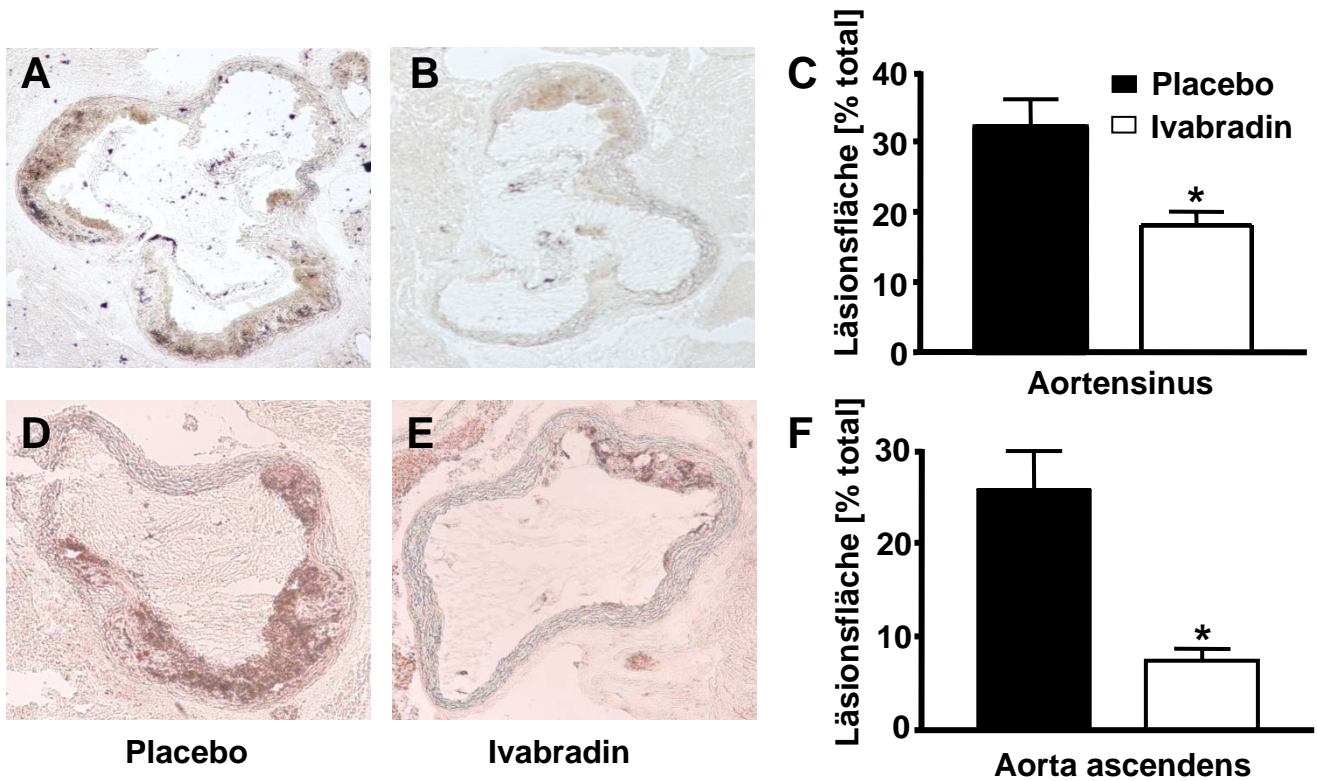
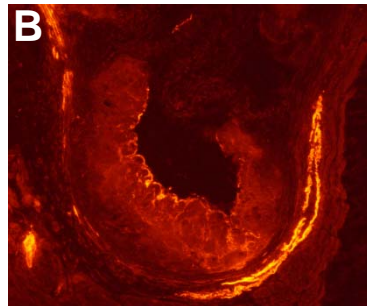
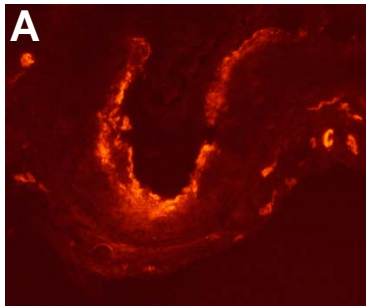


Abb. 7: Atherosklerotische Plaqueformation in ApoE^{-/-}-Mäusen auf Western Type Diet, behandelt mit Ivabradin (10 mg/kg Körpergewicht pro Tag, p.o.) oder Placebo für 6 Wochen im Aortensinus (A-C) und der Aorta ascendens (D-F). Öl-Rot-Färbung, repräsentative Schnitte und histomorphometrische Analyse (mean±SEM; n=10 pro Gruppe; *p<0,05 vs Placebo).

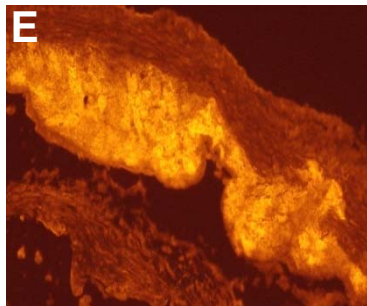
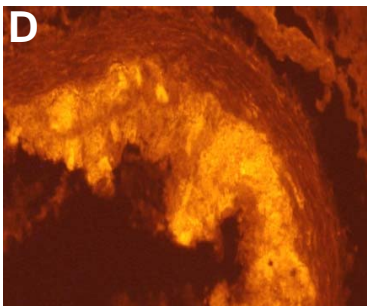
Abbildung 8:

Glatte Muskelzellen



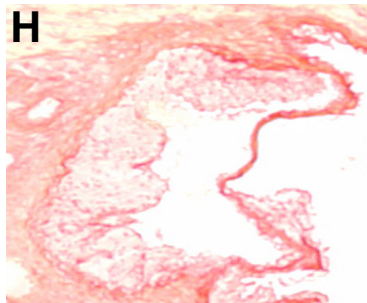
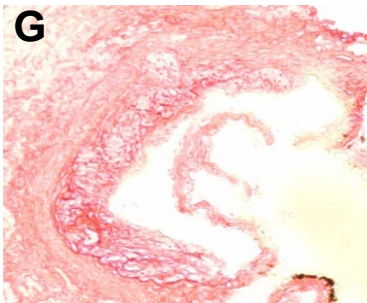
C	Placebo	Ivabradin
	+++	++

Makrophagen



F	Placebo	Ivabradin
	+++	+++

Kollagen



I	Placebo	Ivabradin
	+++	++

Placebo

Ivabradin

Abb. 8: Atherosklerotische Läsionen im Aortensinus von ApoE^{-/-}-Mäusen auf Western Type Diet, behandelt mit Ivabradin (10 mg/kg Körpergewicht pro Tag, p.o.) oder Placebo für 6 Wochen. Alpha-Aktin-Färbung (A-B), Makrophagen-Färbung (D-E), Sirius-Red-Färbung (G-H), repräsentative Schnitte und histomorphologische Analyse der Plaquezusammensetzung (C, F, I) nach folgenden Kriterien:

- + keine positive Reaktion auf Färbung
- ++ leicht positive Reaktion, inhomogene Verteilung in der Läsion
- +++ positive Reaktion, homogene Verteilung
- ++++ gesamter Plaque positiv

Mittels Sirius-Red-Färbung konnte eine quantitative Bestimmung des Kollagengehalts der atherosklerotischen Läsionen durchgeführt werden. Hierbei wiesen die Läsionsflächen der Placebo behandelten Mäuse, verglichen mit den Ivabradin gefütterten Tieren, einen höheren und gleichmäßiger verteilten Kollagengehalt auf (Placebo +++ vs. Ivabradin ++, Sirius-Red-Färbung, **Abbildung 8 G-I**). Da auch das Kollagen für eine festere Zusammensetzung der Plaque sorgt, spricht dieses Ergebnis ebenfalls für eine stabilere Plaquekonstellation in den Placebo gefütterten ApoE-Mäusen.

Zusammenfassend lassen sich die Befunde der scheinbar instabileren Plaques mit gleicher Intensität des entzündlichen Geschehens in den Ivabradin behandelten Mäusen mit einer Verjüngung der atherosklerotischen Plaqueentwicklung erklären. Vermutlich wurde durch die Ivabradinbehandlung das Fortschreiten der Atherosklerose verlangsamt, so dass sich die Plaques der mit Ivabradin gefütterten Tiere in einem früheren Stadium befinden und erst zu einem späteren Zeitpunkt einen mit der Placebogruppe vergleichbaren Anteil an stabilisierenden Strukturen in der Plaquekappe ausbilden.

4.5. Die Herzfrequenzreduktion durch Ivabradin führt zu verminderter Aktivität der NADPH-Oxidase sowie zur Abnahme der Sauerstoffradikalfreisetzung

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) tragen durch verschiedene Mechanismen wesentlich zur Initiierung und Progression atherosklerotischer Prozesse bei. Diese umfassen unter anderem die Inaktivierung von Sauerstoffmonoxid (NO), die Oxidation von Protein- und Lipidbestandteilen sowie die Aktivierung Redox-sensitiver Signalwege⁵⁹. Eine wichtige Quelle für ROS stellt die vaskuläre NADPH-Oxidase dar⁸. Um die Aktivität dieses Enzymkomplexes in Aorten der ApoE-Mäuse zu untersuchen, wurden Messungen der Lucigenin-verstärkten Chemilumineszenz durchgeführt. Im Vergleich zu ApoE-Mäusen mit physiologischer Herzfrequenz ist die Aktivität der aortalen NADPH-Oxidase in den Ivabradin behandelten ApoE^{-/-}-Mäusen um etwa 50% reduziert ($p < 0.05$).

Die vaskuläre Freisetzung des Superoxidradikals wurde mittels L012-Chemilumineszenz-Assays in unbeschädigten Aortensegmenten bestimmt. Hier zeigte sich, dass die ROS-Freisetzung in den Ivabradin behandelten Tieren im Vergleich zu den Placebo behandelten

ApoE-Mäusen signifikant herabgesetzt war ($186,5 \pm 52,5$ vs. $44,2 \pm 17,2$ RLU/ $\mu\text{g}/\text{min}$, $p < 0,05$, **Abbildung 10 A**).

Als globaler Parameter für das Ausmaß vaskulären oxidativen Stresses wurde die Lipidperoxidation in der Gefäßwand der thorakalen Aorta quantifiziert. Im Vergleich zu den Placebo behandelten Tieren wiesen die Mäuse mit reduzierter Herzfrequenz einen signifikant geringeren Gehalt an vaskulären Lipidhydroperoxiden auf ($0,94 \pm 0,04$ vs. $0,61 \pm 0,08$ $\mu\text{mol}/\mu\text{g}$, $p < 0,05$, **Abbildung 9 B**).

Mittels Dihydroethidium-Immunfluoreszenzmikroskopie (DHE) erfolgte eine histochemische Detektion von Sauerstoffradikalen in der Aorta thoracalis. Hier zeigte sich eine wesentliche Reduktion der ROS-Freisetzung durch Herzfrequenzreduktion im Vergleich zu Placebo behandelten Tieren (124 ± 7 vs. 77 ± 5 arbitrary units, $p < 0,01$, **Abbildung 10 B+C**)

Zusammenfassend zeigen die vier applizierten Methoden kohärent sowohl eine verminderte Aktivität eines radikalfreisetzenden Enzymkomplexes, eine reduzierte Lipidperoxidation als auch eine verminderte Freisetzung von ROS unter Behandlung mit Ivabradin. Dies weist auf eine wesentliche Rolle der Herzfrequenz bei der Entstehung von vaskulärem oxidativen Stress hin.

Abbildung 9:

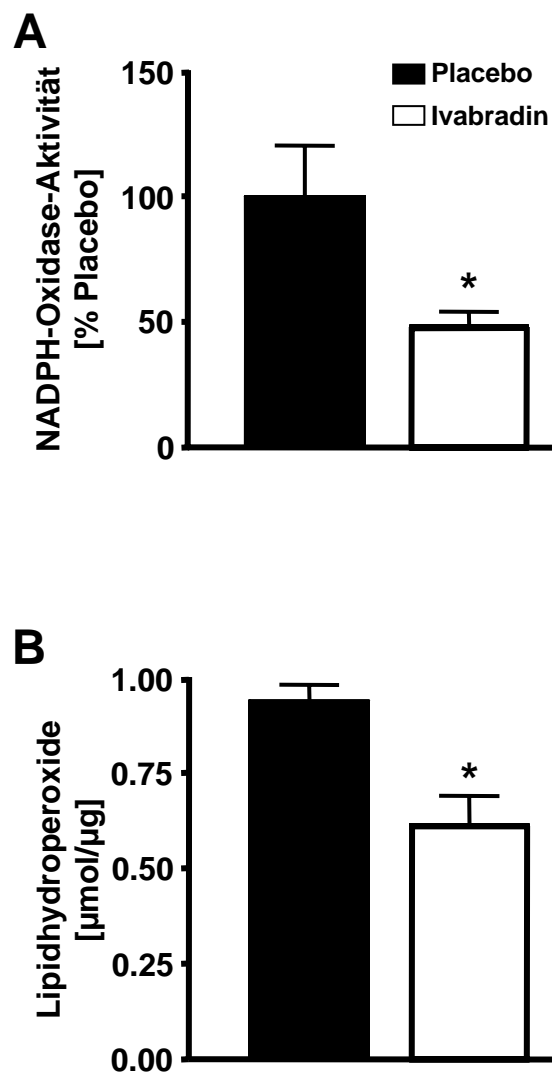


Abb. 9: Vaskulärer oxidativer Stress. Nach 6-wöchiger Behandlung wurden die Aorten von Placebo bzw. Ivabradin (10 mg/kg KG pro Tag, p.o.) behandelten Mäusen entnommen und die NADPH-Oxidase-Aktivität im aortalen Homogenat mittels Lucigenin-angereichertem Chemilumineszenzassay bestimmt (als Substrat diente NADPH (100 µmol/l), 5 µmol/l Lucigenin (A; mean±SEM; n=5 pro Gruppe; * $p < 0,05$ vs Placebo). Die Konzentrationen der Lipidhydroperoxide wurden ebenfalls im aortalen Homogenat ermittelt (B; mean±SEM; n=4 pro Gruppe; * $p < 0,05$ vs Placebo).

Abbildung 10:

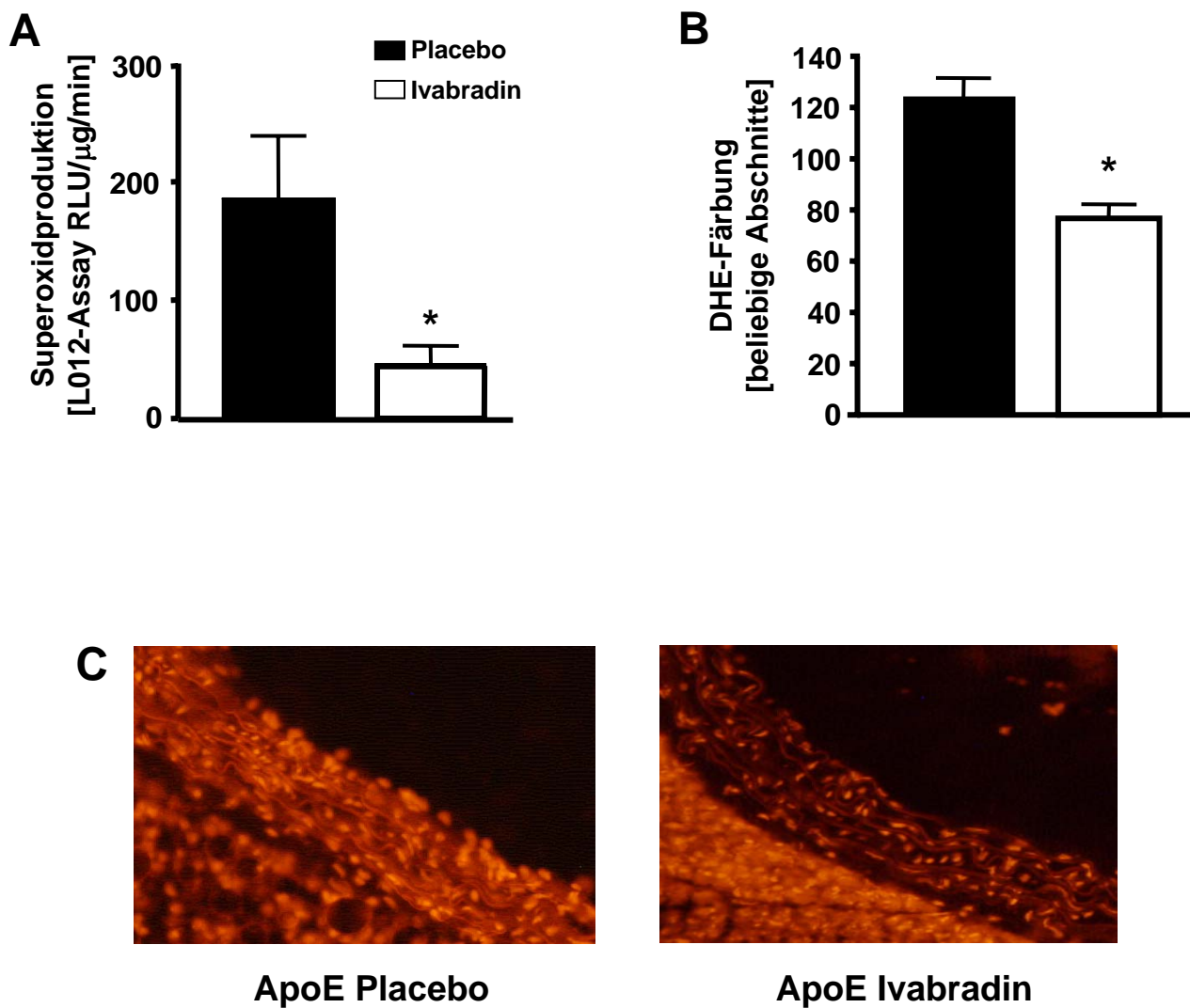


Abb. 10: Vaskulärer oxidativer Stress. Nach 6-wöchiger Behandlung wurden die Aorten von Placebo bzw. Ivabradin (10 mg/kg KG pro Tag, p.o.) behandelten Mäusen entnommen und die Superoxidproduktion in intakten Aortenringpräparaten mittels L012-Chemilumineszenz bestimmt (A; mean \pm SEM; n=6 pro Gruppe; * p <0,05 vs Placebo). Quantifizierung und repräsentative Fluoreszenzmikroskopiepräparate der DHE-Färbung (B-C) (mean \pm SEM; n=5-6 pro Gruppe; * p <0,01 vs Placebo).

5. DISKUSSION

5.1. Applikationsformen von Ivabradin im Tiermodell, Wirkung auf Herzfrequenz und Lipidwerte in ApoE-defizienten Mäusen

Wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung vaskulärer Effekte einer Herzfrequenzreduktion durch $I_{(f)}$ -Kanal-Inhibition im Tiermodell der Apolipoprotein-E-defizienten Maus. Verschiedene tierexperimentelle, vor allem an Mäusen und Ratten durchgeführte Arbeiten, beschreiben eine Behandlung mit Ivabradin. Hierbei handelt es sich primär jedoch um Tiermodelle zur Untersuchung der myokardialen Funktion nach Herzinfarkt und bei Herzinsuffizienz. Eine Anwendung der Substanz im Atherosklerosemodell ist bislang nicht durchgeführt worden. Die vorliegende Arbeit beschreibt erstmalig eine Behandlung von ApoE-Mäusen mit Ivabradin mit dem Ziel einer exklusiven Herzfrequenzreduktion zur Untersuchung möglicher vasoprotektiver Effekte.

Verschiedene Arbeiten beschreiben vornehmlich eine Applikation von Ivabradin über das Trinkwasser, über subkutane sowie intravenöse Injektion^{46,53,60}. Eine orale Applikation über standardisierte Futterpellets ist bislang noch nicht beschrieben. Die Abschätzung der täglich vom Versuchstier aufgenommenen Dosis erfolgte im Vorfeld der Behandlung über die ausführliche Untersuchung der täglich aufgenommenen Futtermenge (3g). Wesentlich für eine Dosisfindung waren Daten von Du et al., die eine Reduktion der Herzfrequenz von etwa 100 Schlägen/min unter einer täglichen Dosis von 10 mg Ivabradin beschreiben⁵³.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung konnte durch orale Behandlung mit einer täglichen Dosis von 10 mg Ivabradin eine signifikante und über einen Zeitraum von 6 Wochen dauerhaft anhaltende Herzfrequenzreduktion von etwa 70 Schlägen/min erreicht und damit die wesentliche experimentelle Grundvoraussetzung der vorliegenden Arbeit erfüllt werden. Korrespondierend mit bis dato publizierten Daten hatte die Gabe von Ivabradin keine Effekte auf den systolischen oder diastolischen Blutdruck. Die Gesamtcholesterinwerte und das LDL-Cholesterin lagen im Rahmen laborchemischer Kontrollen erwartungsgemäß deutlich über den Werten der Kontrollgruppe der Wildtyp-Mäuse. Eine weitere im Sinne der Fragestellung unabdingbare Voraussetzung.

5.2. Endothel und Atherosklerose

Der zentrale neue Befund der vorliegenden Arbeit ist die Verbesserung der Endothelfunktion von ApoE-defizienten Mäusen und die Reduktion der Atherosklerose durch eine selektive Reduktion der Herzfrequenz.

ApoE^{-/-}-Mäuse, die mit einer cholesterinreichen sogenannten "Western-Type"-Diät gefüttert werden, stellen ein etabliertes Modell zur Untersuchung sämtlicher Stadien der Atherogenese ausgehend von Endothelaktivierung und endothelialer Dysfunktion dar^{3,61}. Die Behandlung von ApoE^{-/-}-Mäusen mit Ivabradin führte im Rahmen der vorliegenden Experimente, ohne Effekte auf Blutdruck oder Lipidparameter auszuüben, zu einer signifikant verbesserten endothelabhängigen Vasorelaxation. Die Verbesserung der Endothelfunktion ging mit einer relevanten Reduktion des Plaquevolumens atherosklerotischer Läsionen in der Aorta einher.

Diese Befunde untermauern grundlegende Untersuchungen von Beere und Kollegen, die erstmalig eine relevante Assoziation zwischen Herzfrequenz und Atherogenese im Tiermodell zeigen konnten^{28,29}. Darüber hinaus demonstrieren sie erstmalig, dass auch die Endothelfunktion relevant durch die Herzfrequenz beeinflusst wird. Eine Verbesserung der Endothelfunktion konnte von einer kanadischen Arbeitsgruppe mittlerweile auch in ApoB-100-Mäusen gezeigt werden. Eine Behandlung mit Ivabradin (10 mg/kg/d) führte korrespondierend zu den hier vorgelegten Befunden zu einer Verbesserung der endothelabhängigen Vasorelaxation in zerebralen und in renalen Gefäßen⁶². Vor dem Hintergrund dieser Befunde erlangt die Herzfrequenz - unabhängig von Lipidparametern und arteriellem Blutdruck - zentrale Bedeutung für die Pathogenese der Atherosklerose.

Die morphologische Untersuchung atherosklerotischer Plaques der Aorta zeigte im Gegensatz zur ursprünglichen Hypothese jedoch nicht den erwarteten stabileren Plaque in den Ivabradin gefütterten Tieren. Im Hinblick auf den Anteil der Makrophagen fanden sich zwar keine relevanten Unterschiede zwischen Tieren mit einer Frequenzreduktion und solchen mit physiologischer HF, allerdings könnte das reduzierte Vorkommen von Kollagenfasern und glatten Muskelzellen in den Plaques für eine geringere Stabilität der Läsion sprechen. Da sich dies jedoch konträr zu allen anderen Befunden verhält, sehen wir

keinen Anlass, von einer relevanten Abnahme der Plaquestabilität durch Ivabradin auszugehen. Vielmehr interpretieren wir dieses Ergebnis im Rahmen der weniger weit fortgeschrittenen Reifung der Läsionen in den Ivabradin behandelten Tieren, da die Einwanderung von glatten Muskelzellen und Kollagen erst in einem späteren Stadium der Entstehung einer atherosklerotischen Plaque stattfindet ^{5,15}.

Die dargestellten Effekte von Ivabradin auf die Endothelfunktion und Atherogenese vor Augen, stellt sich die Frage nach den zugrundeliegenden Mechanismen, welche die beschriebenen Effekte vermitteln. Einen Schlüsselfaktor für die vaskuläre Integrität und eine physiologische Vasorelaxation stellt die endotheliale NO-Synthase (eNOS) dar. Eine Regulation der eNOS durch die Herzfrequenz würde daher zum Verständnis der positiven Effekte von Ivabradin auf die Endothelfunktion beitragen. Im Rahmen von im Anschluss an die hier dargestellten Daten durch die Arbeitsgruppe durchgeführten Experimenten erfolgte daher die Untersuchung der Expression der eNOS auf Protein- und auf RNA-Ebene. Sowohl mittels Western Blot als auch mittels Real-Time-PCR ließ sich jedoch kein Effekt einer Herzfrequenzreduktion auf die Expression der eNOS und ihrer phosphorylierten Form (peNOS) nachweisen ⁶³.

Die Gefäßwand unterliegt neben verschiedenen humoralen Einflüssen und Zellinteraktionen vor allem permanenten, durch den Blutfluss definierten hämodynamischen Effekten. Verschiedene experimentelle Arbeiten haben daher direkte hämodynamische und mechanische Einflüsse der Herzfrequenz auf vaskulärer Ebene untersucht und assoziieren grundlegende maladaptive Prozesse mit erhöhter HF. So konnte sowohl im Tiermodell als auch im Rahmen klinischer Untersuchungen eine relevante Beziehung zwischen erhöhter HF und vermehrter vaskulärer (aortaler) Steifigkeit gezeigt werden ^{64,65}. Einige Autoren propagieren auch einen im Rahmen hoher Herzfrequenzen reduzierten bzw. oszillatorischen Scheerstress, welcher ein proatherogenes vaskuläres Umfeld begünstigt. Ein direkter kausaler Zusammenhang zwischen HF und Scheerstress konnte bislang jedoch nicht belegt werden ^{30,66}.

5.3. Wirkmechanismus - Oxidativer Stress?

Kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie, Hypertonus oder Diabetes mellitus sind durch gesteigerten oxidativen Stress gekennzeichnet. Eine vermehrte Freisetzung freier Sauerstoffradikale (ROS) trägt wesentlich zur Entstehung endothelialer Dysfunktion und in der Folge zur Atherogenese bei ⁸. Zur Charakterisierung und Quantifizierung von vaskulärem oxidativen Stress wurden im Rahmen der vorliegenden Experimente verschiedene Methoden angewandt. Neben der Untersuchung der Aktivität der NADPH-Oxidase, einer wesentlichen Quelle vaskulärer freier Sauerstoffradikale ⁶⁷, wurden durch L012-Assays und in-situ Detektion mittels DHE-Färbungen die Freisetzung von ROS aus aortalen Gefäßabschnitten untersucht. Darüber hinaus wurde durch Quantifizierung von Lipidperoxiden ein globaler Indikator für oxidativen Stress verwandt.

Herzfrequenzreduktion durch Ivabradin reduzierte die Enzymaktivität der NADPH-Oxidase, verminderte die ROS-Freisetzung und den Gehalt an Lipidperoxiden. Zusammenfassend weisen diese, anhand vier differenter Assays erhobenen Befunde auf einen signifikant reduzierten vaskulären oxidativen Stress hin. Diese weiteren wesentlichen neuen Befunde der vorliegenden Arbeit bieten gleichzeitig einen Erklärungsansatz für die deutlichen Effekte der HF-Reduktion auf Endothelfunktion und Atherogenese, da beide Phänomene in wesentlichem Umfang durch oxidativen Stress initiiert, getriggert und unterhalten werden ^{3-6,8,9,15,68}.

Weisen die erhobenen Daten auch in erster Linie darauf hin, dass die Wirkungen von Ivabradin auf Endothelfunktion, Atherogenese und vaskulären oxidativen Stress durch eine Senkung der Herzfrequenz vermittelt werden, müssen hier jedoch prinzipiell auch direkte antioxidative Effekte der Substanz diskutiert werden. Eine Arbeit von Heusch et al. weist beispielsweise im Schweinmodell auf mögliche pleiotrope Effekte von Ivabradin hin ⁴⁶. Nach Abschluss der vorliegenden Experimente erhobene Daten der Arbeitsgruppe konnten jedoch keine direkten antioxidativen Effekte nachweisen. Behandlung von vaskulären Zellen wie bovinen aortalen Endothelzellen (BAEC) und glatten Gefäßmuskelzellen (vSMC) mit Ivabradin führte nicht zu einer Inhibition der Angiotensin II (AngII) induzierten Steigerung der NADPH-Oxidase. Überdies blieb auch die AngII vermittelte Radikalfreisetzung in vSMC durch eine Behandlung mit Ivabradin unbeeinträchtigt ⁶³. Eine direkte Behandlung von

Aortenringen im Organbad mit Ivabradin wie auch eine Vorbehandlung von Aortenringen mit Ivabradin vor Carbachol induzierter Relaxation führte nicht zu einer gesteigerten Relaxation der Gefäßpräparate. Diese Daten unterstreichen die Bedeutung der Herzfrequenz für die Vermittlung der beobachteten vasoprotektiven Effekte des $I_{(f)}$ -Kanal-Inhibitors und machen direkte zelluläre oder endotheliale Effekte unwahrscheinlich.

5.4. Potentielle klinische Bedeutung der Befunde

Der bisherige klinische Einsatz von Ivabradin erfolgte zur Verbesserung der Angina Pectoris-Symptomatik. Die vorgelegten Daten sollen die Perspektive eröffnen, Ivabradin zusätzlich auch in prognostischer Indikation einzusetzen.

Auf der Grundlage heutiger verfügbarer epidemiologischer Daten muss die Herzfrequenz als ein unabhängiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Sterblichkeit angesehen werden. Eine Fülle klinischer Studien belegt den prognostischen Vorteil einer Herzfrequenzreduktion bei wesentlichen kardiovaskulären Erkrankungen wie Myokardinfarkt oder Herzinsuffizienz. Bei der stabilen koronaren Herzerkrankung stehen in erster Linie symptomatische Gesichtspunkte einer pharmakologischen Reduktion der HF im Vordergrund.

Neben den etablierten Effekten einer Herzfrequenzreduktion auf kardiale Energetik, Arbeitslast und Sauerstoffbalance rücken zunehmend auch direkte maladaptive vaskuläre Effekte der Herzfrequenz in den Focus. Die Daten der vorliegenden Arbeit belegen eine kausale Rolle der HF für die Pathogenese der Atherosklerose. Erstmals wird im Tiermodell der ApoE-defizienten Maus eine vasoprotektive Wirkung einer reinen Herzfrequenzreduktion durch $I_{(f)}$ -Kanal-Inhibition nachgewiesen.

Diese experimentellen Befunde tragen zum Verständnis klinischer Untersuchungen bei, die sowohl eine klare Assoziation zwischen der Herzfrequenz und der Ausprägung der Atherosklerose als auch verschiedener Surrogatmarker kardiovaskulärer Komplikationen belegen.

Vor allem bei Patienten mit einer koronaren Herzerkrankung ist eine erhöhte Ruheherzfrequenz mit negativen Endpunkten assoziiert²¹. Desweiteren konnte im Rahmen einer retrospektiven Analyse gezeigt werden, dass bei jungen Patienten, die an einem Myokardinfarkt verstarben, das Ausmaß der koronaren Atherosklerose mit einer höheren

Herzfrequenz assoziiert war ²⁷. Neben der Atherosklerose sind auch inflammatorische Surrogatmarker wie das hoch-sensitive-CRP (hsCRP), Fibrinogen und Leukozyten mit einer erhöhten HF assoziiert. In zwei voneinander unabhängigen Untersuchungen konnte eine relevante Korrelation zwischen der HF und subklinischen Entzündungsprozessen durch Nachweis erhöhter hsCRP-, Fibrinogen- und Leukozytenwerte bei gesunden Probanden, die sich allein durch das Vorliegen etablierter kardiovaskulärer Risikofaktoren auszeichneten, ermittelt werden ^{69,70}.

Im Rahmen der 2008 publizierten BEAUTIFUL-Studie wurden erstmalig mögliche prognostische Effekte einer reinen Herzfrequenzreduktion durch Ivabradin untersucht ⁷¹. Geprüft wurde die Wirkung von Ivabradin auf die kardiovaskuläre Sterblichkeit sowie Hospitalisierungsraten für Herzinsuffizienz, Herzinfarkte und die Häufigkeit notwendiger koronarer Revaskularisationen. In Bezug auf das Auftreten einer Herzinsuffizienz und bei Untersuchungen des kombinierten Endpunktes kardiovaskulärer Tod, Hospitalisierung für Herzinfarkt und Neuauftreten oder Verschlechterung einer Herzinsuffizienz waren die Effekte einer pharmakologischen Herzfrequenzsenkung nicht signifikant. Interessanterweise zeigte sich jedoch eine Assoziation der Herzinfarkt-Hospitalisierungsrate und der koronaren Revaskularisationen mit der Herzfrequenz. Bereits ab einer Frequenz von 70 Schlägen pro Minute zeigte sich ein Anstieg der Häufigkeit dieser für die koronare Herzerkrankung relevanten Endpunkte. Bei Patienten mit einer Herzfrequenz von mehr als 70 Schlägen pro Minute vermittelte die Gabe von Ivabradin eine signifikante Abnahme dieser koronarbezogenen Endpunkte. Zusammenfassend demonstrieren die Daten dieser Studie, dass eine Herzfrequenz von ≥ 70 Schlägen pro Minute bei Patienten mit einer KHK das Risiko für koronare Ereignisse signifikant erhöht ^{72,73}. Die primäre Auswirkung der HF auf koronare Endpunkte in der BEAUTIFUL-Studie weist auf ihre Bedeutung für zugrundeliegende vaskuläre Prozesse hin und untermauert das grundsätzliche Paradigma einer gestörten vaskulären Homöostase durch eine erhöhte HF. Um die Effekte einer Herzfrequenzreduktion auf vaskulärer Ebene weitergehend zu charakterisieren, sind jedoch weitere, über die tierexperimentellen Untersuchungen hinausgehende klinische Untersuchungen notwendig. In erster Linie sollten daher die wesentlichen Effekte einer HF-Reduktion im Mausmodell im Rahmen einer klinischen Untersuchung charakterisiert werden.

Zusammenfassend charakterisieren die Befunde der vorliegenden Arbeit eine Reduktion der Atherosklerose und eine Verbesserung der Endothelfunktion in ApoE-Mäusen durch die Reduktion der HF und durch damit verbundenen verminderten vaskulären oxidativen Stress. Diese grundlegenden Mechanismen untermauern wesentliche Befunde verschiedener klinischer Untersuchungen und unterstreichen die Bedeutung der Herzfrequenz als eine wesentliche „Stellgröße“ zum einen für die vaskuläre Morphologie und Integrität und darüber hinaus für die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Quaschnig,T., Ruschitzka,F.T., Maier,W. & Luscher,T.F. [Role of endothelium in the etiology and therapy of atherosclerosis]. *Internist (Berl)* **41**, 355-362 (2000).
2. Galley,H.F. & Webster,N.R. Physiology of the endothelium. *Br. J. Anaesth.* **93**, 105-113 (2004).
3. Laufs,U. Beyond lipid-lowering: effects of statins on endothelial nitric oxide. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **58**, 719-731 (2003).
4. Cai,H. & Harrison,D.G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ. Res.* **87**, 840-844 (2000).
5. Ross,R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* **340**, 115-126 (1999).
6. Lusis,A.J. Atherosclerosis. *Nature* **407**, 233-241 (2000).
7. Groemping,Y. & Rittinger,K. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochem. J.* **386**, 401-416 (2005).
8. Harrison,D., Griendling,K.K., Landmesser,U., Hornig,B. & Drexler,H. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am. J. Cardiol.* **91**, 7A-11A (2003).
9. Laufs,U. *et al.* Physical inactivity increases oxidative stress, endothelial dysfunction, and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 809-814 (2005).
10. Vasquez-Vivar,J., Kalyanaraman,B. & Martasek,P. The role of tetrahydrobiopterin in superoxide generation from eNOS: enzymology and physiological implications. *Free Radic. Res.* **37**, 121-127 (2003).
11. Damani,S.B. & Topol,E.J. Future use of genomics in coronary artery disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* **50**, 1933-1940 (2007).

12. Saunders,E. & Ofili,E. Epidemiology of atherothrombotic disease and the effectiveness and risks of antiplatelet therapy: race and ethnicity considerations. *Cardiol. Rev.* **16**, 82-88 (2008).
13. Rajavashisth,T.B. *et al.* Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature* **344**, 254-257 (1990).
14. Falk,E. Pathogenesis of atherosclerosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* **47**, C7-12 (2006).
15. Libby,P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* **420**, 868-874 (2002).
16. Plump,A.S. *et al.* Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* **71**, 343-353 (1992).
17. Levine,H.J. Rest heart rate and life expectancy. *J. Am. Coll. Cardiol.* **30**, 1104-1106 (1997).
18. Schwinger,R.H., Bohm,M., Koch,A. & Erdmann,E. Force-frequency relation in human heart failure. *Circulation* **86**, 2017-2018 (1992).
19. Mulder,P. *et al.* Long-term heart rate reduction induced by the selective I(f) current inhibitor ivabradine improves left ventricular function and intrinsic myocardial structure in congestive heart failure. *Circulation* **109**, 1674-1679 (2004).
20. Kannel,W.B., Kannel,C., Paffenbarger,R.S., Jr. & Cupples,L.A. Heart rate and cardiovascular mortality: the Framingham Study. *Am. Heart J.* **113**, 1489-1494 (1987).
21. Diaz,A., Bourassa,M.G., Guertin,M.C. & Tardif,J.C. Long-term prognostic value of resting heart rate in patients with suspected or proven coronary artery disease. *Eur. Heart J.* **26**, 967-974 (2005).
22. Hjalmarson,A. *et al.* Influence of heart rate on mortality after acute myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.* **65**, 547-553 (1990).

23. Gillman,M.W., Kannel,W.B., Belanger,A. & D'Agostino,R.B. Influence of heart rate on mortality among persons with hypertension: the Framingham Study. *Am. Heart J.* **125**, 1148-1154 (1993).
24. Reil,J.C. & Bohm,M. The role of heart rate in the development of cardiovascular disease. *Clin. Res. Cardiol.* **96**, 585-592 (2007).
25. Fox,K. *et al.* Resting heart rate in cardiovascular disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* **50**, 823-830 (2007).
26. Wilhelmsen,L. *et al.* The multifactor primary prevention trial in Goteborg, Sweden. *Eur. Heart J.* **7**, 279-288 (1986).
27. Perski,A., Hamsten,A., Lindvall,K. & Theorell,T. Heart rate correlates with severity of coronary atherosclerosis in young postinfarction patients. *Am. Heart J.* **116**, 1369-1373 (1988).
28. Beere,P.A., Glagov,S. & Zarins,C.K. Retarding effect of lowered heart rate on coronary atherosclerosis. *Science* **226**, 180-182 (1984).
29. Beere,P.A., Glagov,S. & Zarins,C.K. Experimental atherosclerosis at the carotid bifurcation of the cynomolgus monkey. Localization, compensatory enlargement, and the sparing effect of lowered heart rate. *Arterioscler. Thromb.* **12**, 1245-1253 (1992).
30. Giannoglou,G.D. *et al.* Elevated heart rate and atherosclerosis: an overview of the pathogenetic mechanisms. *Int. J. Cardiol.* **126**, 302-312 (2008).
31. Soulis,J.V. *et al.* Spatial and phasic oscillation of non-Newtonian wall shear stress in human left coronary artery bifurcation: an insight to atherogenesis. *Coron. Artery Dis.* **17**, 351-358 (2006).
32. Sa,C.R. *et al.* Association between high heart rate and high arterial rigidity in normotensive and hypertensive subjects. *J. Hypertens.* **15**, 1423-1430 (1997).
33. Charlton,G.A. & Crawford,M.H. Physiologic consequences of training. *Cardiol. Clin.* **15**, 345-354 (1997).

34. Gundersen,T., Grottum,P., Pedersen,T. & Kjekshus,J.K. Effect of timolol on mortality and reinfarction after acute myocardial infarction: prognostic importance of heart rate at rest. *Am. J. Cardiol.* **58**, 20-24 (1986).
35. Lechat,P. *et al.* Prognostic value of bisoprolol-induced hemodynamic effects in heart failure during the Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study (CIBIS). *Circulation* **96**, 2197-2205 (1997).
36. Brown,H.F., DiFrancesco,D. & Noble,S.J. How does adrenaline accelerate the heart? *Nature* **280**, 235-236 (1979).
37. Tardif,J.C., Ford,I., Tendera,M., Bourassa,M.G. & Fox,K. Efficacy of ivabradine, a new selective I(f) inhibitor, compared with atenolol in patients with chronic stable angina. *Eur. Heart J.* **26**, 2529-2536 (2005).
38. Shi,W. *et al.* Distribution and prevalence of hyperpolarization-activated cation channel (HCN) mRNA expression in cardiac tissues. *Circ. Res.* **85**, e1-e6 (1999).
39. DiFrancesco,D. & Borer,J.S. The funny current: cellular basis for the control of heart rate. *Drugs* **67 Suppl 2**, 15-24 (2007).
40. DiFrancesco,D. Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu. Rev. Physiol* **55**, 455-472 (1993).
41. Heusch,G. Heart rate in the pathophysiology of coronary blood flow and myocardial ischaemia: benefit from selective bradycardic agents. *Br. J. Pharmacol.* **153**, 1589-1601 (2008).
42. DiFrancesco,D. & Tortora,P. Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature* **351**, 145-147 (1991).
43. Benetos,A., Rudnichi,A., Thomas,F., Safar,M. & Guize,L. Influence of heart rate on mortality in a French population: role of age, gender, and blood pressure. *Hypertension* **33**, 44-52 (1999).
44. DiFrancesco,D. The pacemaker current (I(f)) plays an important role in regulating SA node pacemaker activity. *Cardiovasc. Res.* **30**, 307-308 (1995).

45. Thollon,C. *et al.* Electrophysiological effects of S 16257, a novel sino-atrial node modulator, on rabbit and guinea-pig cardiac preparations: comparison with UL-FS 49. *Br. J. Pharmacol.* **112**, 37-42 (1994).
46. Heusch,G. *et al.* Improvement of regional myocardial blood flow and function and reduction of infarct size with ivabradine: protection beyond heart rate reduction. *Eur. Heart J.* (2008).
47. Bois,P., Bescond,J., Renaudon,B. & Lenfant,J. Mode of action of bradycardic agent, S 16257, on ionic currents of rabbit sinoatrial node cells. *Br. J. Pharmacol.* **118**, 1051-1057 (1996).
48. DiFrancesco,D. & Camm,J.A. Heart rate lowering by specific and selective I(f) current inhibition with ivabradine: a new therapeutic perspective in cardiovascular disease. *Drugs* **64**, 1757-1765 (2004).
49. Camm,A.J. & Lau,C.P. Electrophysiological effects of a single intravenous administration of ivabradine (S 16257) in adult patients with normal baseline electrophysiology. *Drugs R. D.* **4**, 83-89 (2003).
50. Lopez-Bescos,L., Filipova,S. & Martos,R. Long-term safety and efficacy of ivabradine in patients with chronic stable angina. *Cardiology* **108**, 387-396 (2007).
51. Borer,J.S., Fox,K., Jaillon,P. & Lerebours,G. Antianginal and antiischemic effects of ivabradine, an I(f) inhibitor, in stable angina: a randomized, double-blind, multicentered, placebo-controlled trial. *Circulation* **107**, 817-823 (2003).
52. Ruzyllo,W., Tendera,M., Ford,I. & Fox,K.M. Antianginal efficacy and safety of ivabradine compared with amlodipine in patients with stable effort angina pectoris: a 3-month randomised, double-blind, multicentre, noninferiority trial. *Drugs* **67**, 393-405 (2007).
53. Du,X.J. *et al.* I(f) channel inhibitor ivabradine lowers heart rate in mice with enhanced sympathoadrenergic activities. *Br. J. Pharmacol.* **142**, 107-112 (2004).

54. Dedkov,E.I. *et al.* Preservation of coronary reserve by ivabradine-induced reduction in heart rate in infarcted rats is associated with decrease in perivascular collagen. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **293**, H590-H598 (2007).
55. Sukhova,G.K., Williams,J.K. & Libby,P. Statins reduce inflammation in atheroma of nonhuman primates independent of effects on serum cholesterol. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22**, 1452-1458 (2002).
56. LOWRY,O.H., ROSEBROUGH,N.J., FARR,A.L. & RANDALL,R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951).
57. Li,Y. *et al.* Validation of lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a chemilumigenic probe for detecting superoxide anion radical production by enzymatic and cellular systems. *J. Biol. Chem.* **273**, 2015-2023 (1998).
58. Tarpey,M.M. *et al.* Chemiluminescent detection of oxidants in vascular tissue. Lucigenin but not coelenterazine enhances superoxide formation. *Circ. Res.* **84**, 1203-1211 (1999).
59. Brandes,R.P. & Kreuzer,J. Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. *Cardiovasc. Res.* **65**, 16-27 (2005).
60. Gardiner,S.M., Kemp,P.A., March,J.E. & Bennett,T. Acute and chronic cardiac and regional haemodynamic effects of the novel bradycardic agent, S16257, in conscious rats. *Br. J. Pharmacol.* **115**, 579-586 (1995).
61. Osada,J., Joven,J. & Maeda,N. The value of apolipoprotein E knockout mice for studying the effects of dietary fat and cholesterol on atherogenesis. *Curr. Opin. Lipidol.* **11**, 25-29 (2000).
62. Drouin,A. *et al.* Chronic heart rate reduction by ivabradine prevents endothelial dysfunction in dyslipidaemic mice. *Br. J. Pharmacol.* **154**, 749-757 (2008).
63. Custodis,F. *et al.* Heart rate reduction by ivabradine reduces oxidative stress, improves endothelial function, and prevents atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* **117**, 2377-2387 (2008).

64. Benetos,A. *et al.* Determinants of accelerated progression of arterial stiffness in normotensive subjects and in treated hypertensive subjects over a 6-year period. *Circulation* **105**, 1202-1207 (2002).
65. Mircoli,L., Mangoni,A.A., Giannattasio,C., Mancia,G. & Ferrari,A.U. Heart rate-dependent stiffening of large arteries in intact and sympathectomized rats. *Hypertension* **34**, 598-602 (1999).
66. Suo,J. *et al.* Hemodynamic shear stresses in mouse aortas: implications for atherogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 346-351 (2007).
67. Brandes,R.P. & Schroder,K. Composition and functions of vascular nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases. *Trends Cardiovasc. Med.* **18**, 15-19 (2008).
68. Levonen,A.L., Vahakangas,E., Koponen,J.K. & Yla-Herttuala,S. Antioxidant gene therapy for cardiovascular disease: current status and future perspectives. *Circulation* **117**, 2142-2150 (2008).
69. Sajadieh,A. *et al.* Increased heart rate and reduced heart-rate variability are associated with subclinical inflammation in middle-aged and elderly subjects with no apparent heart disease. *Eur. Heart J.* **25**, 363-370 (2004).
70. Rogowski,O. *et al.* Heart rate and microinflammation in men: a relevant atherothrombotic link. *Heart* **93**, 940-944 (2007).
71. Fox,K., Ford,I., Steg,P.G., Tendera,M. & Ferrari,R. Ivabradine for patients with stable coronary artery disease and left-ventricular systolic dysfunction (BEAUTIFUL): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* **372**, 807-816 (2008).
72. Fox,K. *et al.* Heart rate as a prognostic risk factor in patients with coronary artery disease and left-ventricular systolic dysfunction (BEAUTIFUL): a subgroup analysis of a randomised controlled trial. *Lancet* **372**, 817-821 (2008).
73. Reil,J.C. & Bohm,M. BEAUTIFUL results--the slower, the better? *Lancet* **372**, 779-780 (2008).

7. DANKSAGUNG

Mein erster Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Ulrich Laufs für die Überlassung des Themas, für die großzügigen Möglichkeiten der wissenschaftlichen Betätigung in seiner Arbeitsgruppe, sowie für seine stets konstruktiven Kritiken und Hilfestellungen bis zum Schluss.

Insbesondere möchte ich mich bei meinem wissenschaftlichen Betreuer Herrn Dr. med. Florian Custodis für seine hervorragende Unterstützung in allen Abschnitten der Arbeit bedanken. Durch seine ständige Bereitschaft mir geduldig mit seinen hilfreichen Ideen und Kommentaren beratend zur Seite zu stehen, konnte ich diese Arbeit bewältigen.

Ein weiterer großer Dank gilt Ellen Becker und Simone Jäger, den beiden Medizinisch-Technischen Assistentinnen, die mich mit unendlicher Geduld in die gesamte Methodik eingearbeitet haben und mir bei Fragen zu jeder Zeit hilfreich zur Seite standen.

Desweiteren möchte ich mich beim ganzen Team des kardiologischen Forschungslabors bedanken, da sich die gute Stimmung und die uneigennützigere Bereitschaft auf Hilfestellung stets positiv auf meine Motivation ausgewirkt haben.

Schließlich gilt mein großer Dank meinen Eltern, die nicht nur durch ihre finanzielle sondern vor allem durch ihre jahrelange moralische Unterstützung mein Medizinstudium und diese Dissertation ermöglicht haben. Vielen Dank euch beiden!

8. CURRICULUM VITAE

Persönliche Angaben

Name	List
Vorname	Franka
Geburtsdatum	29.04.1984
Geburtsort	Berlin
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schulische Ausbildung

1990 bis 1994	5.Grundschule Berlin Mitte
1994 bis 2003	Friedrich-Engels Gymnasium Berlin
18. Juni 2003	Allgemeine Hochschulreife (Note 1,4)

Studium

Seit Oktober 2003	Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes
13. September 2005	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 2,0)
April 2006 bis April 2008	Promotion auf dem Gebiet der experimentellen Kardiologie
August 2008 bis Juli 2009	Praktisches Jahr in der Universitätsklinik Homburg/Saar

Praktika & Famulaturen

August bis September 2003	Krankenpflegepraktikum Onkologie/Hämatologie (Charité Berlin)
März 2004	Krankenpflegepraktikum Unfallchirurgie (Humboldt-Krankenhaus Berlin)
März 2006	Famulatur in der Hämatologie/Onkologie (Charité Berlin)
März 2007	Famulatur in der Anästhesie (Neunkirchen, Praxis)
August 2007	Famulatur in der Allgemein- und Sportmedizin (Olympiastützpunkt Bern)
Februar 2008	Famulatur in der Anästhesie (Uniklinik Homburg)
März 2008	Famulatur in der Kardiologie/Intensivmedizin (Uniklinik Homburg)

Publikationen

1. Custodis, F., Baumhäkel, M., Schlimmer, N., List, F., Gensch, C., Böhm, M., Laufs, U.
„Heart rate reduction by ivabradine reduces oxidative stress, improves endothelial function, and prevents atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice.”
Circulation 117, 2377-2387 (2008)
2. Weingärtner, O., Lütjohann, D., Ji, S., Weishoff, N., List, F., Sudhop, T., v.Bergmann, K., Gertz, K., König, J., Schäfers, H.-J., Endres, M., Böhm, M., Laufs, U.
„Vascular effects of diet supplementation with plant sterols“
J. Am. Coll. Cardiol. 51, 1553-1561 (2008)

Abstracts

1. Weingärtner, O., Lütjohann, D., Weisshoff, N., List, F., v. Bergmann, K., Böhm, M., Laufs, U. Differentielle Effekte einer Cholesterinresorptionshemmung durch Ezetimibe und pflanzliche Sterole auf die Atherogenese. A 51. Jahreskongress Saarländisch-Pfälzische Internistengesellschaft e.V., Neustadt an der Weinstrasse, 22.-24. Feb. 2007
2. Weingärtner O, Lütjohann, D., Weisshoff, N., List, F., Böhm, M., Laufs, U. Differential Effects of Plant Sterols Compared to Ezetimibe on Atherogenesis in ApoE -/- Mice. J Am Coll Cardiol, 49(9) Suppl. A: 336 (2007)
3. Weingärtner, O., Lütjohann, D., Weisshoff, N., List, F., Böhm, M., Laufs, U. Differentielle Effekte einer Cholesterinresorptionshemmung durch Ezetimibe und pflanzliche Sterole auf die apoE -/-Maus. Clin Res Cardiol 96: Suppl 1, 73 Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, P855 (2007)
4. Weingärtner, O., Lütjohann, D., Weisshoff, N., List, F., v.Bergmann, K., Böhm, M., Laufs, U. Vergleich der Effekte einer Cholesterinresorptionshemmung durch Ezetimibe und durch pflanzliche Sterole auf die Atherogenese. 113. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, P504 (2007)
5. Custodis, F., Baumhäkel, M., Schlimmer, N., List, F., Böhm, M., Laufs, U. Heart rate reduction by I(f)-current inhibition reduces atherosclerosis and improves endothelial as well as erectile function in ApoE-/- mice. European Society of Cardiology Congress 2007, Abstract 4006 (2007)
6. Custodis, F., Baumhäkel, M., Schlimmer, N., List, F., Gensch, C., Böhm, M., Laufs, U. Selective Heart Rate Reduction Via Inhibition of the I(f)-current Prevents Atherosclerosis and Improves Endothelial and Erectile Function in Apoe-/Mice. Scientific Sessions, American Heart Association, Abstract 477 (2007)

7. Custodis, F., Baumhäkel, M., Schlimmer, N., List, F., Gensch, C., Böhm, M., Laufs, U. Selektive Herzfrequenzreduktion durch I(f)-Kanal Inhibition hemmt Atherogenese und verbessert Endothelfunktion und erektile Funktion in ApoE^{-/-}-Mäusen. Clin Res Cardiol 96: Suppl 1, 74. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie. P448 (2008)
8. Custodis, F., Baumhäkel, M., Schlimmer, N., List, F., Gensch, C., Böhm, M., Laufs, U. Ivabradine reduces atherosclerosis and improves endothelial function via reduction of vascular oxidative stress and downregulation of MCP-1. Europ. Heart J. 29: Abstract Supplement 865-866 (2008)
9. Custodis, F., Baumhäkel, M., Schlimmer, N., List, F., Gensch, C., Böhm, M., Laufs, U. The I(f)-inhibitor Ivabradine Exerts Vascular Anti-oxidative And Anti-inflammatory Effects Selectively Mediated By Reduction Of Heart Rate. American Heart Association Scientific Sessions 2008: 1738 (2008)