

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie  
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. Dr. h.c. N. Roewer

**Etablierung einer Langzeitbetablockade am in vivo Herzinfarktmodell der  
Maus**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Christina Juliane Hille

aus Steinfurt

Würzburg, Juni 2016

**Referent:** Prof. Dr. med. Markus Lange

**Korreferent:** Prof. Dr. med. Kai Schuh

**Dekan:** Prof. Dr. med. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 10. Juli 2017

**Die Promovendin ist Zahnärztin**

Meinen lieben Eltern gewidmet

## Inhalt

Abkürzungsverzeichnis .....	i
Einheitenverzeichnis .....	vi
Abbildungsverzeichnis.....	vii
1 Einleitung .....	- 1 -
1.1 Ischämie-Reperfusionsschaden.....	- 1 -
1.1.1 Pathophysiologie des Myokardinfarktes .....	- 2 -
1.1.2 Pathophysiologie des akuten Reperfusionsschadens .....	- 3 -
1.1.3 Pathophysiologie des späten Reperfusionsschadens .....	- 5 -
1.1.4 Kardiale Dysfunktionen.....	- 6 -
1.2 Kardioprotektion .....	- 8 -
1.2.1 Ischämische Konditionierung.....	- 9 -
1.2.1.1 Ischämische Präkonditionierung .....	- 9 -
1.2.1.2 Ischämisch induzierte Postkonditionierung .....	- 12 -
1.2.2 Pharmakologisch induzierte Kardioprotektion.....	- 13 -
1.2.2.1 Anästhetika induzierte Präkonditionierung .....	- 13 -
1.2.2.2 Anästhetika induzierte Postkonditionierung.....	- 15 -
1.3 $\beta$ -adrenerge Rezeptoren.....	- 16 -
1.3.1 Funktion der Betarezeptoren .....	- 16 -
1.3.2 Kardioprotektion durch Betablocker.....	- 19 -
1.3.3 Langzeitbetablockade und Kardioprotektion .....	- 20 -
1.4 Hypothese .....	- 22 -
2 Material und Methoden .....	- 24 -
2.1 Tierhaltung und Versuchstiere .....	- 24 -
2.2 Langzeitbetablockade mittels osmotischer Pumpen .....	- 24 -
2.2.1 Funktion osmotischer Pumpen .....	- 24 -

2.2.2	Durchführung der Pumpenimplantation .....	- 25 -
2.2.3	Narkose und Beatmung .....	- 25 -
2.2.4	Protokoll zur invasiven Hämodynamik.....	- 26 -
2.2.4.1	Hämodynamische Messung mit Conductance-Katheters...	- 26 -
2.2.4.2	Funktion des Conductance-Katheters .....	- 26 -
2.2.4.3	Durchführung der Katheterisierung .....	- 27 -
2.2.5	Protokoll zur Organentnahme für molekularbiologische Untersuchungen .....	- 28 -
2.2.6	Protokoll des in vivo Ischämie/Reperusionsmodells .....	- 29 -
2.2.6.1	Infarktinduktion.....	- 29 -
2.2.6.2	Infarktgrößenbestimmung .....	- 30 -
2.3	Molekularbiologische Auswertung.....	- 31 -
2.3.1	Herstellung der Lysate.....	- 31 -
2.3.2	Proteinbestimmung.....	- 32 -
2.3.3	Elektrophorese .....	- 33 -
2.3.4	Western Blot .....	- 35 -
2.3.5	Antikörper .....	- 36 -
2.3.6	Entwicklung .....	- 38 -
2.3.7	Herstellung der Lysate und RNA-Isolierung.....	- 39 -
2.3.8	cDNA-Synthese .....	- 39 -
2.3.9	Quantitative real-time PCR .....	- 40 -
2.4	Statistische Auswertung.....	- 42 -
3	Ergebnisse .....	- 44 -
3.1	Hämodynamik .....	- 44 -
3.2	Infarktgröße.....	- 46 -
3.3	Ergebnisse der Molekularbiologie mit Western Blot.....	- 47 -

3.4	Ergebnisse der Molekularbiologie mit real-time PCR.....	- 48 -
4	Diskussion.....	- 51 -
4.1	Transkriptionelle und translationelle Veränderungen des β <sub>1</sub> -AR durch eine Langzeitbetablockade.....	- 51 -
4.2	Beeinflussung der Physiologie/Hämodynamik nach Langzeitbetablockade .....	- 54 -
4.3	Beeinflussung der Herzinfarktgröße durch eine Langzeitbetablockade .....	- 56 -
4.4	Voraussetzung für Studie zur Anästhetika-induzierten Kardioprotektion und Übertragbarkeit auf den Menschen.....	- 59 -
5	Zusammenfassung.....	- 62 -
	Literaturverzeichnis.....	- 63 -

## Abkürzungsverzeichnis

AAR	engl. area at risk; Risikoareal
Abb.	Abbildung
AC	Adenylylcyclase
β-AR	β-adrenerger Rezeptor
AIPost	Anästhetika induzierte Postkonditionierung
AMG	Aminoguanin
APC	Anästhetika induzierte Präkonditionierung
Arrb1	β-Arrestin 1
Arrb2	β-Arrestin 2
ATP	Adenonsintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
Ca <sup>2+</sup>	Calciumionen
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cTnI	engl. cardiac troponin I; kardiales Troponin I
cTnT	engl. cardiac troponin T; kardiales Troponin T
Cu <sup>+</sup>	Kupferionen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dP/dt <sub>max</sub>	maximaler Anstieg des linksventrikulären Drucks
eNOs	endotheliale NO-Synthetase

## Abkürzungsverzeichnis

---

EGFR	engl. epidermal growth factor receptor; epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
EKG	Elektrokardiogramm
ERK 1/2	engl. extracellular signal-regulated kinase 1/2
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GC	Guanolyzyklase
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
G <sub>i</sub> -Protein	inhibitorisches G-Protein
G <sub>s</sub> -Protein	stimulatorisches G-Protein
GRK	engl. G-protein coupled receptor kinase; G-proteingekoppelte Rezeptorkinase
GSK3 $\beta$	Glykogen-Synthase-Kinase 3 $\beta$
H <sup>+</sup>	Wasserstoffionen
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HB-EGF	engl. heparin-binding epidermal growth factor; heparinbindender epidermaler Wachstumsfaktor
HCl	Salzsäure
HClO	hypochlorige Säure
HLM	Herzlungenmaschine
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase

## Abkürzungsverzeichnis

---

IPC	ischämische Präkonditionierung
IPost	ischämisch induzierte Postkonditionierung
IRI	Ischämie-Reperfusionsschaden
IS	engl. infarct size; Infarktgröße
K <sup>+</sup>	Kaliumionen
K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumphosphatdehydrogenat
mATPK <sup>+</sup> -Kanal	mitochondrialer ATP-sensitiver Kaliumkanal
mPTP	engl. mitochondrial permeability transition pore, mitochondriale Permeabilitätspore
MI	Myokardinfarkt
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MPO	Myeloperoxidase
Na <sup>+</sup>	Natriumionen
NaCl	Natriumchlorid; Kochsalzlösung
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinukleotid Phosphat
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase
NSTEMI	engl. Non-ST-Elevation Myocardial Infarction Nicht-ST-Streckenhebungsinfarkt
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OH	Hydroxyl-Radikale
OH <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxid-Anionen

## Abkürzungsverzeichnis

---

PAF	Plättchenaktivierungsfaktor
PDK	phosphoinositolabhängige Kinase
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PLM	Phospholamban
p-PLM	phosphoryliertes Phospholamban
PMN	polymorphkernige Granulzyten
PTCA	perkutane transluminale Koronarangioplastie
RIC	engl. remote ischemic conditioning; ischämische Fernkonditionierung
RIPC	engl. remote ischemic preconditioning
RPerC	engl. remote perconditioning
rpm	engl. revolutions per minute; Umdrehungen pro Minute
RIPostC	engl. remote ischemic postconditioning
RISK Pathway	Reperfusion Injury Salvage Kinase Pathway
ROS	engl. reactive oxygen species; freie Sauerstoffradikale;
SD	engl. standard deviation; Standardabweichung
Ser	Serin
SERCA	Ca <sup>2+</sup> -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
STEMI	engl. ST-Elevation Myocardial Infarction, Nicht-ST-Streckenhebungsinfarkt

## Abkürzungsverzeichnis

---

Thr	Threonin
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid

## Einheitenverzeichnis

d	Tage
g	Gramm
h	Stunde
k	Kilo-
l	Liter
M	Molar
m	Milli-
μ	Mikro-
MAC	engl. minimal alveolar concentration; minimale alveoläre Konzentration
min	Minute
n	Nano-
s	Sekunde

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung zur Übersicht der Kardioprotektion..	- 8 -
Abbildung 2: Signalweg der ischämischen Präkonditionierung .....	- 12 -
Abbildung 3: $\beta$ -adrenerge Signaltransduktion in Kardiomyozyten .....	- 18 -
Abbildung 4: Graphische Darstellung des LTBB TC Modells an der Maus ..	- 29 -
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Gesamtprotokolls der LTBB und Infarktinduktion an der Maus .....	- 30 -
Abbildung 6: HF in den linksventrikulären Conductance-Messungen.....	- 44 -
Abbildung 7: Kontraktilität in den linksventrikulären Conductance- Messungen.....	- 45 -
Abbildung 8: IS als Anteil der AAR (in %), LTBB.....	- 46 -
Abbildung 9: WB $\beta_1$ -AR TC .....	- 47 -
Abbildung 10: PCR $G_{nas}$ TC .....	- 48 -
Abbildung 11: PCR Arrb1 TC .....	- 49 -
Abbildung 12: PCR $\beta_1$ -AR TC .....	- 50 -

# 1 Einleitung

Aufgrund des demographischen Wandels und der damit einhergehenden steigenden Lebenserwartung, wird der perioperativ tätige Arzt vor neue Herausforderungen gestellt. In den Industrieländern stellen Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems den größten Anteil unter den Todesursachen dar, wobei die koronare Herzerkrankung (KHK), der akute Myokardinfarkt (MI) und die Herzinsuffizienz die häufigsten Ursachen sind [1]. Das operative Risiko steigt bei Patienten über 70 Jahre und besonders vorbestehende verminderte Herzfunktionen erhöhen die Morbidität und Mortalität [2-4]. Auch wenn zahlreiche Indizes wie zum Beispiel der Goldmanindex zur Bestimmung der Risikofaktoren entwickelt wurden, können perioperative Komplikationen nicht sicher vorausgesagt werden [5]. Um das Herz vor ischämischen Phasen und deren Folgen zu schützen, bedarf es der Entwicklung kardioprotektiver Maßnahmen.

## 1.1 Ischämie-Reperfusionsschaden

Der akute MI entsteht überwiegend durch eine Okklusion einer Koronararterie, beispielsweise kann es durch die Ruptur einer vulnerablen Plaque zur appositionellen Thrombusbildung mit konsekutivem Gefäßverschluss kommen. Zu unterscheiden ist der Nicht-ST-Hebungsinfarkt (engl. Non ST-Elevation Myocardial Infarction, NSTEMI) von dem ST-Hebungsinfarkt (engl. ST-Elevation Myocardial Infarction, STEMI). Diagnostisch lassen sich die infarkttypischen ST-Streckenveränderungen bei dem STEMI im Elektrokardiogramm (EKG) darstellen und über den Nachweis des kardialen Markers Troponin. Bei dem NSTEMI bleiben die Veränderungen im EKG aus [6]. Der Goldstandard in der Therapie des akuten MI stellt die Wiedereröffnung der Koronararterie bzw. die Wiederherstellung des Blutflusses dar, um die Perfusion zu gewährleisten [7]. Dies erfolgt bei einem akuten transmuralen MI idealerweise mittels perkutaner transluminaler Koronarangioplastie (engl. percutaneous transluminal coronary

angioplasty, PTCA), Fibrinolyse oder chirurgischer Bypassoperation. Durch die notwendige Wiederherstellung der Perfusion kommt es jedoch in dem zuvor schon durch die Ischämie verletzten Gewebe zu weiteren Schädigungen des Myokardgewebes. Dieser Prozess wird als Ischämie-Reperfusionsschaden (engl. ischemia reperfusion injury, IRI) bezeichnet [8-10].

### **1.1.1 Pathophysiologie des Myokardinfarktes**

Die Ischämietoleranz des Myokards liegt zwischen zwei bis vier Stunden. Gelingt die Perfusion innerhalb der ersten zwei Stunden, kann ein Zelluntergang des Gewebes vollständig verhindert werden, innerhalb von vier Stunden ist dies nur noch zum Teil möglich [11, 12]. Reimer et al. zeigten in einer tierexperimentellen Studie bei Hunden, dass sich der irreversible Gewebsschaden transmural vom subendothelialen Myokard stetig weiter bis zum subepikardialen Myokard ausbreitet. Das Subepikard, welches weniger ischämisch ist, erleidet demnach später einen irreversiblen Gewebsschaden und profitiert nach fortgeschrittener Zeit noch von einer Reperfusionstherapie [13].

Durch die Ischämie und den damit verbundenen Mangel an Sauerstoff, Glucose und dem fehlenden Abtransport von Metaboliten, reagiert die Myokardzelle mit metabolischen und biochemischen Veränderungen. Der Energiebedarf der Zelle kann nicht mehr gedeckt werden und es resultiert eine Störung im Energiegleichgewicht. Die adenosintriphosphat (ATP)-abhängigen Prozesse, wie der Ionentransport, können nicht mehr reibungslos ablaufen. Ebenso hat nach 15-20 Sekunden der Okklusion die Umstellung auf die anaerobe Glykolyse zellschädigende Auswirkungen [14]. Der intrazelluläre Anstieg von sauren Stoffwechselprodukten wie Laktat aus der anaeroben Energiegewinnung hat eine Azidose zur Folge, welche die Integrität der Zellmembran zerstört, das osmotische Gleichgewicht kann nicht mehr aufrechterhalten werden. Folglich kommt es osmotisch bedingt zu Zellschwellungen [15]. Falls die Schwellung zunimmt und die Zelle rupturiert, entsteht eine Entzündungsreaktion, die weitere Schäden hervorrufen kann. Die Folge sind kardiale Dysfunktionen.

Zu unterscheiden ist die Nekrose von der Apoptose, die einen programmierten Zelltod darstellt. Bei der Apoptose bleiben die Zellen zunächst intakt. Die DNA wird fragmentiert und die Zellen degenerieren. Dadurch, dass die Zellen bei der Apoptose lange intakt bleiben und schnell beseitigt werden, entsteht keine Entzündungsreaktion. Die Nekrose wird unter anderem als Folge von Toxinen oder chemischen Veränderungen eingeleitet. Bei der Nekrose als teilweise gesteuerter Zelltod schwellen die Zellen an. Es kommt zu einer Entzündungsreaktion als Folge der Zellruptur [16]. Freude et al. wiesen zwar die Apoptose in der Ischämiephase nach, belegten aber, dass die Nekrose den größten Teil des Zelluntergangs im Myokard ausmacht [8].

### **1.1.2 Pathophysiologie des akuten Reperfusionsschadens**

Durch die Reperfusion, welche eine unvermeidbare Therapiemaßnahme nach einem akuten MI darstellt, kann es zu weiteren Schädigungen des Myokards kommen. Bei der Entstehung des Reperfusionsschadens nehmen freie Sauerstoffradikale (engl. reactive oxygen species, ROS) eine bedeutende Rolle ein. Zu diesen reaktiven Stoffen gehören Superoxid-Anionen ( $\text{OH}_2^-$ ), Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) und Hydroxyl-Radikale ( $\text{OH}^\cdot$ ). ROS sind stark reaktionsfreudige Verbindungen, die Proteindenaturierungen, Deaktivierungen von Enzymen und Peroxidierungen von Lipiden hervorrufen können [9]. Schon während der Ischämiephase, aber hauptsächlich in der initialen Reperusionsphase ist eine sehr hohe Konzentration an ROS festzustellen. Dieses Phänomen wird als oxidativer „Burst“ bezeichnet [17]. Die Bildung der ROS ist wiederum abhängig von der Intensität der Ischämie [17]. Die Generierung der ROS kann verschiedene Quellen haben. Nachgewiesen wurde die Entstehung extrazellulär durch Leukozyten [18], Arachidonsäure [19] und intrazellulär durch Mitochondrien [20]. Die Bildung von ROS durch die Mitochondrien stellt dabei den größten Anteil dar. Die ROS bewirken eine Öffnung der nicht selektiven mitochondrialen Permeabilitätsporen (engl. mitochondrial permeability transition pore, mPTP) wodurch das ATP abgebaut wird und eine zu hohe intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration resultiert. Durch die chemischen Veränderungen tritt die Nekrose der Myokardzelle ein [21]. Ebenso

wurde die Apoptose als Folge der Öffnung der mPTP nachgewiesen. Durch die Öffnung kommt es zu einer Entkopplung in der Atmungskette, wodurch das Membranpotenzial nicht mehr aufrechterhalten werden kann und Proteine wie das Cytochrom C können aus dem Intermembranraum in das Zytosol austreten. Das Cytochrom C aktiviert die Caspase, ein proteolytisches Enzym, welche wiederum die Apoptose der Zelle einleitet [22]. Demzufolge nimmt die mPTP eine zentrale Rolle bei der Entstehung des IRI ein.

Im Endothel verursachen die ROS eine Inaktivierung von Stickstoffmonoxid (NO). Durch die Inaktivierung werden die Thrombozytenaggregation verstärkt und die Koronararterien an der Dilatation gehindert [23]. Darüber hinaus kann auch das Endothel während der Reperfusion ROS mit Hilfe der Xanthinoxidase bilden, die dann zu Zellschädigungen führen und im Zelltod enden können [24].

Den neutrophilen Leukozyten ist bei der Produktion von ROS eine große Bedeutung zuzuschreiben. Die neutrophilen Granulozyten, auch polymorphkernige Granulozyten (PMN) genannt, nehmen eine wichtige Stellung bei der Abwehr von Infektionen ein, da sie in den Granula Enzyme enthalten, die eine Elimination von Pathogenen wie zum Beispiel Bakterien bewirken. Ein wichtiges Enzym für die Abwehr ist die Myeloperoxidase (MPO), die  $\text{OH}^-$  und hypochlorige Säure (HClO) produziert [25]. Ferner katalysiert die Nikotinamid Adenin Dinukleotid Phosphat (NAPDH)-Oxidase der PMN die Bildung von  $\text{OH}_2^-$  [10]. Diese proteolytischen Enzyme rufen im entzündeten Gewebe wiederum Zellschäden hervor. Der okklusionsabhängige Myokardschaden hat eine lokale Entzündungsreaktion zur Folge, die noch weitere PMN rekrutiert. Dadurch wird der Gewebsschaden weiter verstärkt [26].

Die PMN werden von proinflammatorischen Zytokinen aktiviert und mittels Chemotaxis bereits während der ischämischen Phase angelockt [27]. Die Generierung chemotaktischer Faktoren erreicht ihren Maximalwert ein bis zwei Stunden nach Beginn der Reperfusion und den Normalwert nach vier Stunden [28]. Diese Zytokine sind unter anderem Komplementfaktoren, Tumornekrosefaktoren  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ), Plättchenaktivierungsfaktoren (PAF) oder verschiedene Interleukine (IL) sein. Ziel der ROS sind Myokardzellen oder

Endothelzellen, an denen sie Schäden hervorrufen, wodurch die Permeabilität des Endothels gesteigert wird [26]. Des Weiteren kommt es zu einer erhöhten Expression von Adhäsionsmolekülen und dadurch zu einer vermehrten Adhäsion von Neutrophilen am Endothel [29]. In der frühen Reperfusionphase fungieren die Selektine als Adhäsionsmoleküle. P-Selektin ist nicht konstitutiv auf den Endothelzellen ausgebildet. Die Synthese kann aber durch erhöhte ROS-Konzentration oder durch andere Entzündungsmediatoren wie Thrombin induziert werden [30, 31]. Die Expression von L-Selektin ist konstitutiv auf der Oberfläche der Leukozyten vorhanden und stellt den Liganden für P-Selektin dar [32].

### **1.1.3 Pathophysiologie des späten Reperfusionsschadens**

Nicht nur während der Ischämie- und der frühen Reperfusionphase kommt es zum Zelltod, es treten noch Stunden bis Tage nach dem Ischämieereignis Zellschäden ein. Maßgeblich an diesen späten Schäden scheint NO beteiligt zu sein. Die induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS) wird 24-72 Stunden nach Beginn der Ischämie aktiviert und ist für die Synthese von NO verantwortlich [33]. In Versuchen am Kaninchenmodell wurden die Auswirkungen des Inhibitors Aminoguanidin (AMG) der iNOS auf die kardiale Leistung untersucht. Durch den Inhibitor konnte eine Verbesserung der kardialen Leistung, der koronaren Durchblutung und eine Infarktgrößenreduktion nachgewiesen werden. Das Infarktareal war in der Gruppe mit stetiger Gabe von AMG um circa 30% kleiner als in der Placebogruppe [34]. Auch Rochitte et al. demonstrierten, dass noch zwei Tage nach der Ischämie eine Zunahme des Infarktgewebes und der mikrovaskulären Obstruktion zu verzeichnen ist [35].

Die PMN haben auch in der späten Phase einen Einfluss auf den Reperfusionsschaden. Zhao et al. stellten in einer tierexperimentellen Studie an Hunden fest, dass sich die Leukozyten in den ersten sechs Stunden der Reperfusionphase intravaskulär befinden und in den folgenden 24 Stunden ins Myokard wandern. 28 Stunden nach Beginn der Reperfusion wurde die höchste Konzentration an PMN nachgewiesen [36]. Mit Hilfe dieser transendothelialen

Migration entstehen Schäden an den Kardiomyozyten, die durch die Neutrophilen vermittelt werden [37]. Nach zwei bis drei Tagen der späten Reperfusionphase erreicht der Zelltod durch Nekrose sein Maximum [36].

### 1.1.4 Kardiale Dysfunktionen

Es liegen insgesamt vier Formen des myokardialen Reperfusionsschadens vor: Die Arrhythmie [38, 39], das myokardiale Stunning [40], das no-reflow Phänomen [41, 42] und der letale myokardiale Reperfusionsschaden. Verschiedene Mediatoren wie oxidativer Stress, intrazelluläre Erhöhung des Kalziumspiegels, die schnelle Wiedereinstellung des physiologischen pH-Wertes während der Reperfusion und das entzündliche Geschehen tragen zur Entstehung des Schadens bei. Die Aktivierung der oben genannten Mediatoren bewirkt die Öffnung von mPTP-Kanälen im Mitochondrium. Diese Öffnung spielt eine entscheidende Rolle bei der Entstehung des myokardialen Zelltods [43].

Die Arrhythmie zeigt sich einerseits während der Ischämiephase und endet teilweise im plötzlichen Herztod des akuten MI, andererseits tritt sie auch während der Reperfusion als Folge der Wiederherstellung des Blutflusses auf, woraufhin ebenfalls der plötzliche Herztod eintreten kann. Die Arrhythmie zählt zu den reversiblen Reperfusionsschäden und tritt schon in den ersten Sekunden der Reperfusionphase auf. Diese Rhythmusstörung kann sich entweder in vorzeitigen ventrikulären Kontraktionen, ventrikulären Tachykardien oder in oft letal verlaufende ventrikulären Fibrillationen äußern [38]. Schon 1984 zeigten Manning et al. in einer *in vivo* Studie an Ratten, dass durch die Gabe von Allopurinol die reperfusionsbedingte ventrikuläre Fibrillation vermindert oder gar aufgehoben werden kann. Allopurinol ist ein Inhibitor der Xanthin-Oxidase, die an der Bildung der ROS beteiligt ist [44].

Das myokardiale Stunning beschreibt eine reversible Einschränkung im Kontraktionsverhalten des Herzmuskels und stellt einen subletalen Schaden dar. Auch bei dieser postischämischen Dysfunktion sind ROS von Bedeutung. Zudem spielt die veränderte Kalziumhomöostase der Kardiomyozyten bei der Entstehung von myokardialem stunning ebenso eine Rolle. Aufgrund der

Umstellung auf die anaerobe Glykolyse während der Ischämie und die daraus entstehende intrazelluläre Laktatanreicherung wird der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher stimuliert, wodurch die  $\text{Na}^+$ -Konzentration in der Zelle steigt. Die erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration resultiert schließlich aus der erhöhten Aktivität des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers [45]. Kalzium nimmt eine wichtige Stellung bei der elektromechanischen Kopplung ein, es wandelt elektrische Signale in eine mechanische Kontraktion der Herzmuskelzelle um. Kalziumionen strömen über die spannungsabhängigen L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in die Myokardzelle ein und triggern wiederum den Ausstrom von Kalziumionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) über Ryanodinrezeptoren. Die freigesetzten Kalziumionen binden an Troponin C und leiten so die Kontraktion der Myofilamente ein [46]. Folglich wird die Bedeutung der gestörten Kalziumhomöostase bei der Entstehung von kardialen Dysfunktionen deutlich.

Das no-reflow Phänomen ist gekennzeichnet durch eine mikrovaskuläre Obstruktion nach erfolgter Reperfusion, wobei die Durchblutung des Myokardgewebes insuffizient ist. Das Phänomen zählt zu den irreversiblen Gewebsschäden wurde erstmals 1972 von Kloner et al. beschrieben. In dieser Studie zeigte sich jedoch das no-reflow Phänomen erst ab 90-minütiger Ischämie und wurde begleitet von Gewebsschäden und Zellschwellungen. Endothelschwellungen konnten jedoch auch schon nach 40 Minuten der Okklusion nachgewiesen werden [47]. Die no-reflow Region zeichnet sich zudem durch Gewebsödeme, Endothelschäden und verminderte Perfusion durch Mikrothromben und durch Einwanderung von neutrophilen Granulozyten aus. Die Begleitentzündung wird, wie oben schon beschrieben, ebenfalls von freien Radikalen getriggert. Engler et al. zeigten, dass das Herausfiltern von Neutrophilen aus dem Blut das Ausmaß des no-reflow Phänomens herabsetzt und die myokardialen Ödeme verringert [48]. Die pathologischen Veränderungen des oben genannten Phänomens entstehen und verstärken sich während der Reperfusion, so dass das no-reflow Phänomen zu den Reperfusionsschäden gezählt werden kann [49-51]. Patienten mit dieser Form der kardialen Dysfunktion haben eine schlechte klinische Prognose [52].

## 1.2 Kardioprotektion

Nach einem akuten MI gilt es den koronaren Blutfluss wiederherzustellen. Um den IRI zu verringern und eine Kardioprotektion zu erzielen, wurden verschiedene Therapieansätze entwickelt. Hierzu zählen ischämische Konditionierungen und pharmakologische Interventionen, die in den Signaltransduktionsweg eingreifen. Trigger stellen bei der Konditionierung induzierte Ischämien oder verschiedene Pharmaka dar. Bei den ischämischen Interventionen wird in Bezug auf den zeitlichen Stimulus zwischen drei Konditionierungsformen unterschieden: Die ischämische Präkonditionierung (IPC), Postkonditionierung (IPost) und Fernkonditionierung (RIC). Ebenfalls kann pharmakologisch unter anderem mit der Gabe von volatilen Anästhetika eine Kardioprotektion erzielt werden. Auch bei dieser Form wird in Abhängigkeit von dem zeitlichen Stimulus zwischen Anästhetika induzierter Präkonditionierung (APC) und Anästhetika induzierter Postkonditionierung (AIPost) unterschieden.

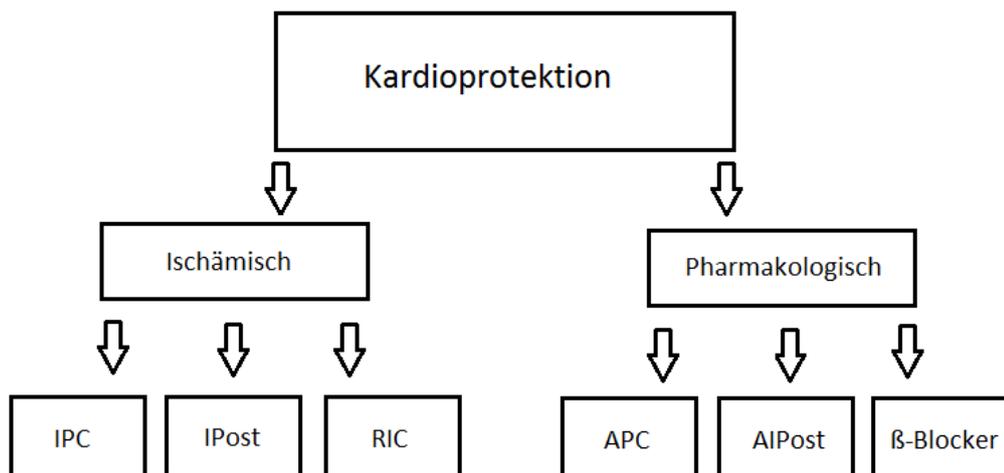


Abbildung 1: Schematische Darstellung zur Übersicht der Kardioprotektion

## **1.2.1 Ischämische Konditionierung**

Bei der IPC werden vor einem Ischämieereignis einzeitig oder mehrzeitig Ischämien induziert, die als Trigger dienen. Dadurch wird das Herz bei dem Eintritt eines Infarktes geschützt und die IRI minimiert. Das Myokard wird somit widerstandsfähiger. Entscheidend hierbei ist, dass der Trigger während der eigentlichen Ischämie nicht mehr vorhanden ist.

Die IPost beschreibt ebenfalls einen Mechanismus zur Kardioprotektion. Im Gegensatz zur Präkonditionierung ergibt sich ein Vorteil bezüglich der klinischen Anwendung, da dieser Mechanismus nach Eintritt eines Infarktes angewendet werden kann. Dabei wird die Reperfusionphase nach einem myokardialen Infarktereignis von repetitiven, kurzen ischämischen Zyklen unterbrochen.

Eine andere Methode zur Kardioprotektion stellt die Fernkonditionierung (engl. Remote Ischemic Conditioning; RIC) dar. Mittels Fernkonditionierung eines anderen Organs oder einer Extremität können kardiale IRI minimiert werden [53].

### **1.2.1.1 Ischämische Präkonditionierung**

Der Mechanismus der IPC wurde 1986 erstmals von Murry et al. beschrieben. Es erfolgten vier Zyklen einer jeweils fünf Minuten andauernden Okklusion und Reperfusion vor einer 40-minütigen Koronararterienokklusion. Bei den Tieren, deren Herzen präkonditioniert wurden, konnte die Infarktgröße (engl. infarct size; IS) um etwa 75% herabgesetzt werden. Wurde allerdings die Koronararterienokklusion auf drei Stunden verlängert, konnte kein Unterschied bezüglich der IS zwischen präkonditionierten und nicht präkonditionierten Herzen festgestellt werden [54].

Die Widerstandsfähigkeit des Myokards gegen eine Ischämiephase dauert ein bis zwei Stunden nach der Präkonditionierung an [55]. Diese Phase wird Erstes Fenster genannt. Marber et al. fanden 1993 heraus, dass außerdem ein Zweites Fenster der Kardioprotektion besteht und nach 24 Stunden eintritt. Diese Toleranzphase hält zwischen 48 und 72 Stunden an [56]. Zwischen den

beiden Fenstern besteht demnach keine erhöhte Widerstandsfähigkeit des Myokards. Ein Zyklus anstatt vier mit jeweils fünf Minuten Ischämie- und Reperfusionenphase ist für die Erzielung des Zweiten Fensters ausreichend [57].

Ein entscheidendes Merkmal der IPC und auch der APC ist die Memoryphase. Diese Phase hält von Beginn an der Präkonditionierung zwischen 30 Minuten und zwei Stunden an. In dieser Zeit ist das Myokard vor dem Eintritt eines weiteren MI geschützt. Ursächlich für die Entstehung der Memoryphase ist die Öffnung des ATPK<sup>+</sup>-Kanals, da durch dessen Blockade die Memoryphase aufgehoben wird [58].

Woolfson et al. untersuchten erstmals die Rolle von NO bei der IPC. Die Studie an isolierten Kaninchenherzen ergab, dass die Inhibition der NO-Synthese vor dem Reperfusionsschaden schützt und adenosinabhängig ist [59]. Adenosin wird in großen Mengen während einer myokardialen Ischämie freigesetzt, wenn ein Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffbedarf und -angebot herrscht [60]. Neben Adenosin leiten noch andere Mediatoren, die von der Myokardzelle während der Präkonditionierung freigesetzt werden, eine Signalkaskade zur Kardioprotektion ein (Abbildung 2: Signalweg der ischämischen Präkonditionierung: [61, 62]). Dieser Signaltransduktionsweg, der auch Trigger pathway genannt wird, beginnt an der myokardialen Zellmembran und endet im Mitochondrium. Die Agonisten Adenosin, Bradykinin und Opiode sowie  $\alpha_1$ - und  $\beta$ -Rezeptoren ( $\beta$ -AR) aktivieren G-Proteine. Diese leiten das Signal mit Hilfe von verschiedenen Mediatoren wie Metalloproteinasen, heparinbindende epidermale Wachstumsfaktoren (engl. heparin-binding epidermal growth factor; HB-EGF), Tyrosin-Kinasen weiter. Verschiedene Kinasen wie die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), phosphoinositol-abhängige Kinasen (PDK), Akt, endotheliale NO-Synthetase (eNOS) befinden sich intrazellulär und werden aktiviert. Das freigesetzte NO leitet eine Kaskade zur Aktivierung der Guanolylylzyklase (GC), des zyklischen Guanosinmonophosphats (cGMP) und der Proteinkinase G (PKG) ein. Dabei ist die PKG an der Außenmembran des Mitochondriums lokalisiert und phosphoryliert ein Zielprotein, welches das Signal zur Proteinkinase C weiterleitet, die sich im Intermembranraum befindet.

Die PKC bewirkt unter Beteiligung der ROS eine Aktivierung des mitochondrialen ATP-sensitiven  $K^+$ (mATPK<sup>+</sup>)-Kanals [63]. Die Beeinflussung des mATPK<sup>+</sup>-Kanals scheint eine Schlüsselrolle in der Vermittlung der Kardioprotektion einzunehmen, da dessen Öffnung eine Inhibition mPTP bewirkt. Die vermehrte Öffnungswahrscheinlichkeit der mPTP ist verantwortlich für die Induzierung einer myokardialen Nekrose [64]. Durch die IPC wird auch der Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway aktiviert. Dieser Signaltransduktionsweg ist ein weiterer der IPC und führt zur Kardioprotektion während der Reperfusion [65, 66].

Spear et al. wiesen auf die duale Rolle des  $\beta_1$ -AR bei der IPC hin. So konnten sie zeigen, dass eine Blockade des  $\beta_1$ -AR während der Okklusions- und Reperfusionsphase zu einer Kardioprotektion führt. Eine Blockade während der Präkonditionierung hob jedoch die kardioprotektiven Effekte der IPC auf [67]. Demnach muss eine zeitliche Abhängigkeit der Betablockade mit der kardioprotektiven Wirkung bestehen.

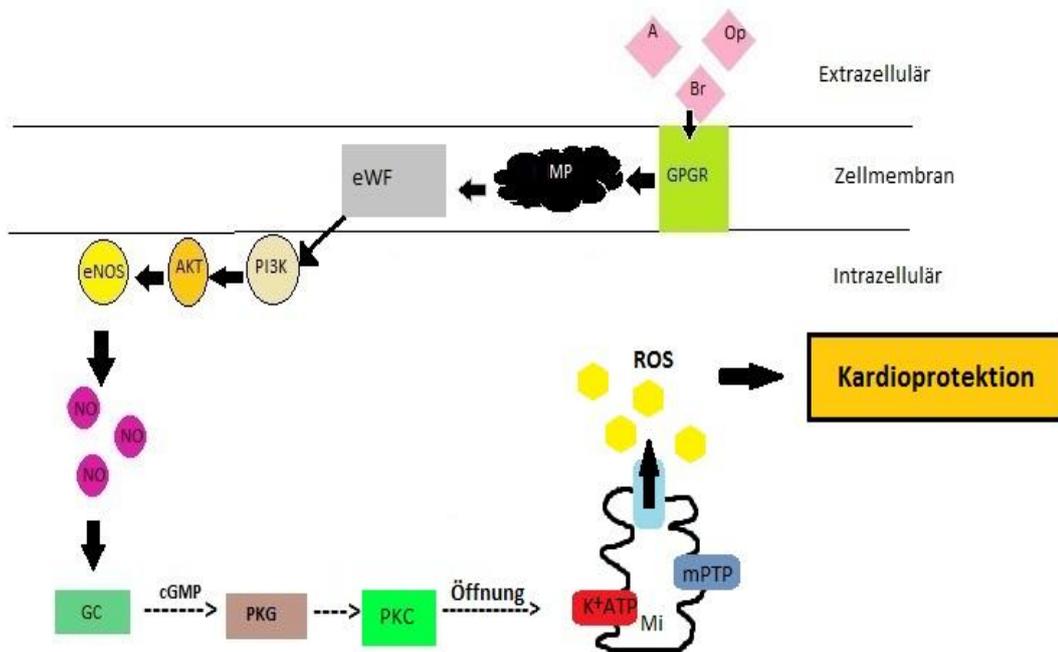


Abbildung 2: Signalweg der ischämischen Präkonditionierung:

A (Adenosin); Br (Bradykinin); Op (Opioid); GPGR (G-proteingekoppelter Rezeptor); MP (Metalloproteinase); eWF (epidermaler Wachstumsfaktor); PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase); eNOS (endotheliale NO-Synthetase); GC (Guanolyzyklase); cGMP (zyklisches Guanosinmonophosphat); PKG (Proteinkinase G); PKC (Proteinkinase C); K<sup>+</sup>ATP (kaliumabhängiger ATP-Kanal); Mi (Mitochondrium); mPTP (engl. mitochondrial permeability transition pore, mitochondriale Permeabilitätspore); ROS (freie Sauerstoffradikale); modifiziert nach Krieg 2004 [62].

### 1.2.1.2 Ischämisch induzierte Postkonditionierung

Zhao et. al konnten erstmals in einer experimentellen Studie an Hunden belegen, dass durch IPost eine Reduktion der IS erreicht werden kann. Es erfolgten nach einer 45-minütigen Koronarokklusion drei Zyklen einer jeweils 30s anhaltenden Reperfusion und Reokklusion der linken Koronararterie. Dabei konnte die IS von 47% auf 11% gesenkt werden [68].

Die Kardioprotektion der IPost wird durch Signaltransduktionswege vermittelt, die Gemeinsamkeiten mit denen der IPC aufweisen. Als wichtige Elemente seien hier PI3K, Akt, eNOS, NO, Proteinkinase A (PKA), PKC, PKG und die extrazellulär regulierte Kinase (engl. extracellular signal-regulated kinase; ERK)

1/2 genannt [69]. Bei der IPost spielt der RISK pathway eine bedeutende Rolle in der Verminderung des Reperfusionsschadens [66, 70]. Der RISK pathway wird in der frühen Phase der Reperfusion pharmakologisch eingeleitet und aktiviert antiapoptotisch wirksame Kinasen wie die ERK 1/2, PKC und Akt [69].

### **1.2.2 Pharmakologisch induzierte Kardioprotektion**

Als Trigger für eine Kardioprotektion können nicht nur Ischämien, sondern auch Pharmaka verwendet werden. Diese können Adenosine [71], Opiode [72] und Nitroglyceride sein [73]. Auch volatile Anästhetika tragen zur Verminderung des IRI bei. Es wird zwischen APC und AIPost unterschieden.

#### **1.2.2.1 Anästhetika induzierte Präkonditionierung**

Die APC beruht auf der Applikation volatiler Anästhetika vor einer längeren Ischämiephase, um eine Verringerung der IRI zu erlangen. Im Jahr 1988 bewiesen Waltier et al. erstmals, dass durch Halothan oder Isofluran die Myokardfunktion nach 15-minütiger Koronarokklusion positiv beeinflusst wird [74]. Das Ausmaß der Kardioprotektion durch die APC ist vergleichbar mit der der IPC [75].

In tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass Halothan, Isofluran und Desfluran die IS reduzieren, wobei Desfluran die größte Wirkung zu haben scheint. Für Sevofluran konnte in der Studie von Piriou et al. an Kaninchen keine IS-Reduktion festgestellt werden [76]. Jedoch wurde erwiesen, dass Sevofluran einen positiven Effekt auf die endotheliale Glykokalyx hat und vor Endothelschäden in der Ischämie- und Reperfusionsphase schützt [77].

Lange et al. fanden heraus, dass bei der APC für Desfluran eine Schwellendosis existiert. Die Tiere wurden in verschiedene Gruppen eingeteilt. Sie erhielten unterschiedliche Dosen Desfluran entweder 30 oder 90 Minuten lang oder wiederholt unterschiedlich hohe Dosen vor einer 30-minütigen Koronarokklusion. Nach Erreichen eines Schwellenwertes, der zwischen 0,5 und 1,0 MAC (minimale alveoläre Konzentration) liegt, konnte keine weitere IS-Reduktion durch eine Dosiserhöhung erzielt werden. Nur durch eine repetitive

Anwendung mit Memoryphasen konnte die Schwellendosis gesenkt werden [78].

Die Signaltransduktionswege der APC decken sich zu einem großen Teil mit denen der IPC. Somit wird auch die APC durch die Aktivierung der Adenosin-, Bradykinin- und Opioidrezeptoren eingeleitet [79-81]. Ebenso spielen die ATPK<sup>+</sup>-Kanäle im Mitochondrium eine bedeutende Rolle in der Weiterleitung der APC, da die Blockade dieser Kanäle die APC aufhebt [82]. Die Aktivierung erfolgt durch die ROS und durch verschiedene Isoformen der PKC [83, 84]. Hohe mitochondriale Kalziumspiegel sind charakteristisch für den IRI. Riess et al. demonstrieren, dass die Aktivierung von ATPK<sup>+</sup>-Kanälen die Kalziumkonzentration während der Ischämie- und Reperfusionphase im Mitochondrium abschwächen und somit kardioprotektiv wirken [85]. In einer *in vivo* Studie an Kaninchen konnte die Signaltransduktion über den  $\beta_1$ -AR aufgezeigt werden. Die Kurzzeitapplikation des Betablockers Esmolol inhibierte die APC mit Desfluran und Sevofluran, hatte jedoch keinen Einfluss auf die IS [86].

Sasaki et al. belegten in einer Studie an Ventrikelmyozyten vom Kaninchen, dass auch NO, welches von der NOS gebildet wird, die ATPK<sup>+</sup>-Kanäle aktiviert [87]. Auch bei der APC existiert ein Zweites Fenster nach 24 Stunden wie bei der IPC. Dies konnten Tanaka et al. an Kaninchen mit Sevofluran nachweisen. Von Bedeutung ist NO vorwiegend im Zweiten Fenster, da in dieser Phase die NOS hochreguliert wird und NO gleichzeitig als Trigger und Mediator fungiert [88]. Die Relevanz des NO wird dadurch untermauert, dass eine Blockade der NOS die APC unwirksam machen kann [89].

Weiterhin konnte in einigen klinischen Studien festgestellt werden, dass die APC kardioprotektive Wirkung besitzt. Zudem wurde in einer weiteren Studie bei Patienten, die sich einer Aortenklappenoperation mit Sevofluran unterzogen haben, postoperativ eine verminderte Freisetzung von Troponin I festgestellt [90]. Troponin I ist ein sensitiver Marker für Myokardschäden [91]. Auch noch nach einem Jahr postoperativ führte die Präkonditionierung mit Sevofluran zu verminderten kardialen Komplikationen [92]. Fellahi et al. bewiesen gegenteilige

Effekte. Diese Arbeitsgruppe zeigte, dass postoperativ keine Signifikanz bezüglich der Tropon I-Freisetzung zu verzeichnen ist [93]. Auch de Hert et al. wiesen in einer Übersichtsarbeit auf die heterogene Studienlage bezüglich der klinischen Ergebnisse hin [94].

### **1.2.2.2 Anästhetika induzierte Postkonditionierung**

Die Arbeitsgruppe um Preckel und Schlack konnten zeigen, dass die Gabe von volatilen Anästhetika wie Enfluran, Isofluran, Sevofluran und Desfluran während der frühen Phase der Reperfusion die Größe des Infarktes minimieren. Die kardioprotektive Wirkung konnte sowohl am *in vitro* Modell [95] als auch am *in vivo* Modell des Kaninchens belegt werden [96].

Es ergaben sich jedoch Unterschiede bezüglich der Reduktion des Reperfusionsschadens bei den einzelnen Anästhetika. Enfluran, Desfluran und Sevofluran zeigten eine Minimierung der IS, wobei die Infarktgröße bei Isofluran unverändert blieb [96]. Auch für Halothan konnte eine Verminderung des Reperfusionsschadens in einer *in vivo* Studie an Kaninchen nachgewiesen werden [97].

Es ließ sich belegen, dass der Zeitpunkt bezüglich der Gabe von Desfluran in Bezug auf die IS-Reduktion von Bedeutung ist. Eine Studie am *in vivo* Modell von Kaninchen zeigte, dass die Verabreichung von Desfluran vor dem Infarktereignis (Präkonditionierung) eine kardioprotektive Wirkung vermittelt. Wird jedoch Desfluran bei der AIPost schon während der Ischämiephase verabreicht, wurde keine Kardioprotektion nachgewiesen. Lediglich in der frühen Reperusionsphase wurde ein kardioprotektiver Effekt bestätigt [98]. In derselben Studie konnte bewiesen werden, dass die Desfluran-induzierte Postkonditionierung unter der Vermittlung von NO erfolgt. Die Studie von Haelewyn et al. steht jedoch im Widerspruch zu den Ergebnissen von Smul et al. Sie zeigten 2004 am *in vitro* Modell von Ratten, dass Desfluran eine Kardioprotektion zeitlich unabhängig, also auch während der Ischämiephase, erzielt [99].

Bei der AIPost konnte ebenfalls die Beteiligung des RISK pathways gezeigt werden. Chiari et. al konnten 2005 erstmals am *in vivo* Kaninchenmodell nachweisen, dass der PI3K-Signaltransduktionsweg nicht nur bei der IPost, sondern auch bei der AIPost mit Isofluran aktiviert wird [100]. Zudem konnte in derselben Studie gezeigt werden, dass Isofluran während der frühen Phase der Reperfusion die Phosphorylierung der PI3K erhöht. Isofluran beeinflusst ebenso die PKB, indem es die Glykogen-Synthase-Kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) phosphoryliert und somit die mPTP inhibiert [101]. Durch die Inhibition entsteht ein kardioprotektiver Effekt, da die Öffnung der mPTP ein Indikator für Apoptose und Nekrose bei einem ischämischen Reperfusionsschaden ist [102, 103].

Zudem wurde belegt, dass die AIPost wie auch die APC über  $\beta$ -AR vermittelt wird, da eine kurzzeitige Blockade der Rezeptoren die AIPost mit Desfluran aufhebt. Gleichzeitig wurde in der Studie bewiesen, dass eine  $\beta_1$ -Blockade während der Reperfusion kardioprotektiv wirkt [104].

### 1.3 $\beta$ -adrenerge Rezeptoren

Die  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren ( $\beta$ -AR) gehören zu der Klasse der Adrenorezeptoren und werden in  $\alpha$ -,  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - und  $\beta_3$ -Subtypen unterteilt. Am Herzen kommt in großer Menge der  $\beta_1$ -AR, aber auch der  $\beta_2$ -AR ist vertreten. Somit sind etwa viermal so viele  $\beta_1$ -AR gegenüber  $\beta_2$ -AR vertreten [105]. Die Aktivierung der  $\beta_1$ -AR und der nachgeschalteten Signaltransduktionskaskade bewirkt eine Steigerung der Inotropie und Chronotropie. Im Ventrikel resultiert nach Stimulierung des  $\beta_1$ -AR eine maximale Kontraktionskraft, durch Stimulierung des  $\beta_2$ -AR wird nur eine submaximale Kraft erreicht [106].

#### 1.3.1 Funktion der Betarezeptoren

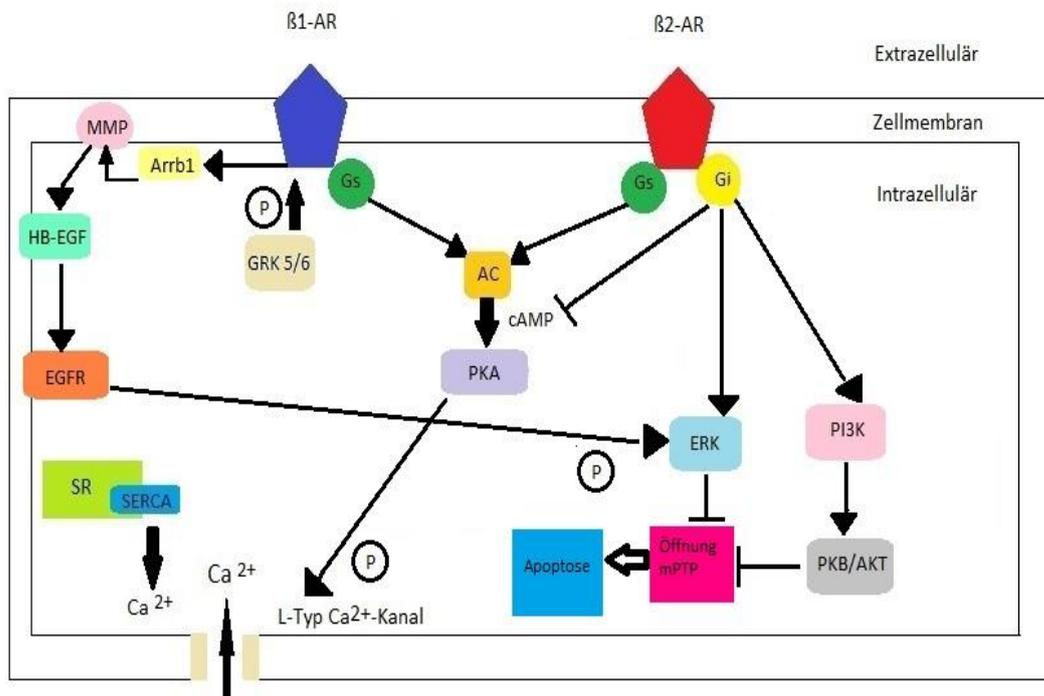
$\beta$ -AR führen zu einer Kopplung der G-Proteine, wobei die  $\beta_1$ -AR  $G_s$  (stimulatorisches G-Protein)-gekoppelt sind und die  $\beta_2$ -AR zusätzlich auch  $G_{i/o}$  (inhibitorisches G-Protein)-gekoppelt sein können. Bei dem Signalweg über  $G_s$ -Proteine werden nach Aktivierung der  $\beta$ -AR durch die körpereigenen Hormone Noradrenalin oder Adrenalin die Adenylylcyclase (AC) aktiviert. Die AC

katalysiert die Bildung des second messengers cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat), dessen Konzentrationsspiegel sich im Zytosol erhöht. Durch cAMP wird die PKA aktiviert und diese phosphoryliert sarkolemmale L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle. Die Phosphorylierung der L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle bewirkt einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle und triggert über die Ryanodinrezeptoren die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA), damit weiteres  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) ausströmt. Die Kalziumionen binden an das Troponin C der Myofilamente und erreicht damit die Kontraktion [107-109]. Infolgedessen entsteht die positiv chronotrope, inotrope und lusitrope Wirkung am Herzen.

Bei steigender intrazellulärer Kalziumkonzentration binden die Kalziumionen an den Calmodulinrezeptor, der wiederum die Calcium-Calmodulin-Kinase (CamKII) aktiviert. CamKII ist somit für den Kalziumhaushalt zuständig, indem es Kalziumionen zurück in das SR transportiert. Phospholamban (PLB), welches am SR lokalisiert ist, wird durch die CamKII an Threonin-17 oder PKA-abhängig an Serin-16 phosphoryliert. In diesem Zustand wird die Aktivität der SERCA gesteigert und weitere Kalziumionen ins SR aufgenommen [110]. Zhu et al. zeigten, dass die Apoptose nicht nur über die cAMP-PKA-Signaltransduktion erfolgt, sondern auch nach anhaltender  $\beta_1$ -AR-Stimulation PKA-unabhängig über die CamKII [111].

Nach persistierender  $\beta_2$ -Stimulierung erfolgt eine Umkopplung des  $G_s$ -abhängigen auf den  $G_i$ -PI3K-PKB/AKT-Signalweg und auf die  $G_i$ -MAPK/ERK-Signalkaskade. Diese Umschaltung entsteht vermutlich durch die PKA-vermittelte Phosphorylierung des Rezeptors. Folglich kann das  $G_i$ -Protein an den Rezeptor binden, wobei die  $G_s$ -AC-cAMP-PKA-Signaltransduktion inhibiert wird. Die Aktivierung der PKB/AKT und der ERK hemmt die Öffnung der mPTP-Kanäle und löst dadurch antiapoptotische Effekt aus (Abbildung 3:  $\beta$ -adrenerge Signaltransduktion in Kardiomyozyten: [112, 113]). Des Weiteren kann auch die Aktivierung des antiapoptotischen EGFR-ERK-Signalwegs über  $\beta$ -Arrestin 1 (Arrb1) G-Proteinunabhängig erfolgen. Nach Stimulierung des  $\beta_1$ -AR wirkt Arrb1 mit als G-Protein-Ligand. Mit Hilfe der G-Proteingekoppelten

Rezeptorkinase 5/6 (engl. G-protein coupled receptor kinase, GRK 5/6) wird das Signal über Matrix-Metalloproteinasen (MMP) an HB-EGF weitergeleitet. HB-EGF dient als Ligand für EGFR (engl. epidermal growth factor receptor; epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor) welcher durch Phosphorylierung die ERK stimuliert. Diese löst wie bei der  $G_i$ -gekoppelten Signaltransduktion die antiapoptotische Wirkung durch die verminderte Öffnungswahrscheinlichkeit der mPTP-Kanäle aus [114, 115].



**Abbildung 3:  $\beta$ -adrenerge Signaltransduktion in Kardiomyozyten:**

Gs (stimulierendes G-Protein); Gi (inhibitorisches G-Protein); AC (Adenylylzyklase); cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat); PKA (Proteinkinase A); SR (sarkoplasmatisches Retikulum); SERCA ( $Ca^{2+}$ -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums); PI3K (Phosphatidylinositol3-Kinase); PKB (Proteinkinase B); ERK (extrazellulär regulierte Kinase); GRK (G-protein gekoppelte Rezeptor Kinase); HB-EGF (engl. heparin-binding epidermal growth factor, heparinbindender epidermaler Wachstumsfaktor); EGFR (engl. epidermal growth factor receptor, epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor); Arrb1 ( $\beta$ -Arrestin); MMP (Matrix-Metalloproteinase); mPTP (engl. mitochondrial permeability transition pore, mitochondriale Permeabilitätspore) P (Phosphorylierung); modifiziert nach Xiao 2006

### 1.3.2 Kardioprotektion durch Betablocker

Betablocker blockieren kompetitiv  $\beta$ -AR [116]. Es gibt unselektive und selektive Betablocker. Zu den unselektiven gehört beispielsweise Propanolol. Dieser blockiert beide Subtypen:  $\beta_1$  und  $\beta_2$ . Die selektiven Betablocker wirken hauptsächlich, aber nicht nur, auf den  $\beta_1$ -AR. Hierzu gehören Bisoprolol, Metoprolol oder auch Atenolol. Es existiert eine weitere Gruppe von Betablockern, die sogenannte dritte Generation. Beispiele sind Nebivolol und Carvedilol, der zusätzlich noch dilatatorische Eigenschaften besitzt [117]. Betablocker wirken negativ chronotrop, dromotrop, inotrop und lusitrop. Durch den negativen inotropen und chronotropen Effekt kann der Sauerstoffverbrauch gesenkt werden. Deswegen werden sie häufig bei Arrhythmie, Hypertonie, Herzinsuffizienz und bei Myokardinfarkten zur besseren Prognose eingesetzt [118].

Bei einer *in vitro* Studie an Schweinen wurde während der Ischämiephase ein Anstieg von den Katecholaminen Noradrenalin, Adrenalin und Dopamin im myokardialen Interstitium registriert. Der größte Konzentrationsanstieg war bei Noradrenalin zu verzeichnen [119]. Spear et al. fanden heraus, dass eine Blockade der  $\beta_1$ -AR kardioprotektiv wirkt und genauso effektiv zu sein scheint wie die Präkonditionierung [67]. Dieselbe Arbeitsgruppe fand in einer zuvor durchgeführten Studie heraus, dass die Kardioprotektion durch die  $\beta_1$ -AR-Blockade PKA-abhängig ist und die PKA-Blockade während der Reperfusion den IRI verminderte [120]. Die  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -AR scheinen jedoch gegenteilige Effekte auszulösen. Die Aktivierung des  $\beta_1$ -AR hat nicht nur Auswirkungen auf die Ino- und Chronotropie, sondern leitet auch die Apoptose in der Ischämie- und Reperusionsphase ein. Der  $\beta_1$ -AR wirkt über den cAMP-PKA-Signalweg apoptotisch. Der  $\beta_2$ -AR hingegen ist  $G_i$ -gekoppelt und aktiviert die ERK, die eine antiapoptotische Wirkung auslöst. Im Umkehrschluss wurde die ERK-vermittelte Kardioprotektion aufgehoben, indem ein  $G_i$ -Inhibitor, das Pertussistoxin, zugegeben wurde [121].

In der Aktualisierung der Leitlinien der AHA (American Heart Association) und ACCF (American College of Cardiology Foundation) von 2009 wird eine

Fortführung der Gabe von Betablockern perioperativ empfohlen (Klasse-I-Empfehlung), wenn die Patienten schon präoperativ mit Betablockern behandelt wurden [122]. Schon in den 1990er Jahren wurde die kardioprotektive Wirkung von Betablockern, die perioperativ verabreicht wurden, belegt. In dieser randomisierten, doppelblinden Studie wurden Risikopatienten entweder Atenolol oder ein Placebo verabreicht. Es ließ sich belegen, dass myokardiale Ischämien postoperativ bei der Gabe von Atenolol um etwa 50% reduziert wurden [123]. Auch Mangano et al. verabreichten in einer Studie entweder Atenolol oder ein Placebo an Patienten mit einem Risiko für eine koronare Herzkrankheit. Die Gabe des Betablockers erfolgte vor und sofort nach der nichtkardialen Operation intravenös und weiterhin oral während des Krankenhausaufenthaltes. Die Ergebnisse zeigten, dass die Mortalität und kardiovaskuläre Komplikationen in der Atenololgruppe besonders während der ersten sechs bis acht Monate nach der Entlassung aus dem Krankenhaus reduziert wurden. Diese protektiven Effekte hielten mindestens bis zu zwei Jahre an [124]. Hingegen wurde zwar in der POISE Studie die positive Wirkung perioperativer Betablockade bezüglich des Myokardinfarktes bestätigt, jedoch wiesen die Patienten mit einem Risiko für Atherosklerose, die Metoprolol erhielten, eine höhere Inzidenz auf an einem Apoplex zu erkranken oder an den Folgen kardiovaskulärer Komplikationen zu versterben als jene, die lediglich ein Placebo erhielten. Die Metoprolol- oder Placebogabe erfolgte zwei bis vier Stunden vor dem Eingriff und wurde für 30 Tage postoperativ fortgeführt [125].

Darüber hinaus wurde in einer klinischen Studie belegt, dass eine Kurzzeitapplikation von Metoprolol nach einem akuten MI die IS reduziert, wenn es vor der Wiederherstellung der Reperfusion verabreicht wird [126].

### **1.3.3 Langzeitbetablockade und Kardioprotektion**

Die Aktivierung des Sympathikus und der damit im Zusammenhangstehende, zuvor erwähnte Anstieg der Katecholamine ist ein wichtiger Mechanismus, um während einer Ischämie das kardiale Auswurfvolumen aufrecht zu erhalten und die Inotropie zu gewährleisten. Eine langanhaltende Stimulation des Sympathikus hat jedoch schwerwiegende Folgen und führt zu einer Progression

der chronischen Herzerkrankung [127]. Die negativen Auswirkungen eines langanhaltenden Überschusses an Katecholaminen wurden zum Einen *in vitro* an Kardiocyten gezeigt, bei denen Noradrenalin toxische Effekte verursachte [128]. In klinischen Studien wurde belegt, dass Pharmaka, die einen Anstieg an Katecholaminen hervorrufen, eine Erhöhung der Morbidität und Mortalität bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz hervorrufen [129]. Eine Verbesserung der kardialen Parameter kann jedoch mit der Langzeitanwendung von Betablockern erzielt werden.

Es zeigte sich, dass die Verbesserung der Symptome der Herzinsuffizienz und die geringere Morbidität dosisabhängig sind. Die Verminderung der Gesamtmorbidität und das Risiko für einen Krankenhausaufenthalt aufgrund von kardiovaskulären Erkrankungen wurde um 71% mit 5 mg Carvedilol und um 80% mit 20 mg Carvedilol pro Tag reduziert [130]. In der COMET Studie stellte sich heraus, dass die Mortalität unter Carvediloltherapie bei Herzinsuffizienz geringer war als unter Metoprololgabe [131].

In einer weiteren *in vitro* Studie wurden Membranen von menschlichen Ventrikelzellen entnommen und demonstriert, dass die Dichte der  $\beta_1$ -AR bei Herzinsuffizienz im Ventrikel stark abnimmt, die der  $\beta_2$ -AR jedoch nahezu konstant bleibt [132]. Schon 1989 verzeichneten Heilbrunn et al. in einer klinischen Studie an Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie eine Zunahme der  $\beta$ -Rezeptordichte unter der Gabe von Betablockern. Metoprolol wurde über sechs Monate verabreicht und die Dichte zu Beginn und nach sechsmonatiger Verabreichung ermittelt. Es stellte sich heraus, dass sich die Dichte der  $\beta$ -AR nach der halbjährigen Behandlung mit Metoprolol verdoppelt hat. Dieser Anstieg ging mit einem verbessertem Ansprechen der  $\beta$ -AR auf Katecholamine einher [133]. Eine Zunahme der  $\beta$ -AR war unter Gabe des Betablockers Carvedilol nicht festzustellen und auch keine Sensibilisierung des auf den katecholaminansprechenden Signalweg [134].

Das Phänomen der Sensibilisierung der  $\beta$ -AR wurde von Hall et al. *in vitro* und *in vivo* bestätigt. Die Studie ergab, dass durch Atenolol eine höhere Empfindlichkeit der  $\beta_2$ -AR auf Katecholamine erzielt wurde und durch  $\beta_2$ -

Stimulierung bessere inotropische Effekte resultierten [135]. Dieses Phänomen bestätigte die Arbeitsgruppe um Motomura, die ebenfalls eine Sensibilisierung des Rezeptors *in vitro* feststellten, obwohl die Dichte der  $\beta_2$ -AR unter Betablockergabe unverändert blieb und nur die Dichte der  $\beta_1$ -AR anstieg [136]. Ferner zeichnete sich eine verbesserte Ansprechbarkeit der  $\beta_2$ -AR verursacht durch  $\beta_1$ -AR-Blocker *in vivo* aus [137].

Die Gabe von Langzeitbetablockern hatte zudem einen positiven Effekt auf die diastolischen Funktion bei Patienten mit vermindertem Auswurfvolumen [138]. Unter Metoprolol konnte eine Verbesserung der linksventrikulären Füllung in der Diastole nach einem akuten Myokardinfarkt festgestellt werden. Die Veränderungen in der Diastole traten während der ersten drei Monate der Metoprololgabe auf, nach zwölf Monaten eine Verbesserung in der Systole [139].

So konnte in vielen Studien die kardioprotektive Wirkung von Betablockern bewiesen werden, jedoch muss die ambivalente Rolle der  $\beta$ -AR berücksichtigt werden. Es wurde bestätigt, dass eine Betablockade so effektiv wie eine Präkonditionierung zu sein scheint [67]. Andererseits führt eine akute Betablockade mit Esmolol zu einer Aufhebung der APC mit Desfluran und Sevofluran und zu einer Abschwächung der IPC [86].

### 1.4 Hypothese

Ziel dieser Arbeit ist, die Etablierung und molekularbiologische Charakterisierung einer Langzeitbetablockade der Maus. Dieses neue Modell soll Anwendung in der Erforschung des Ischämie-Reperfusionsschadens und der Kardioprotektion durch Anästhetika-induzierte Konditionierung finden.

1. Die Langzeitbetablockade führt im Verlauf zu transkriptionellen und translationellen Veränderungen im  $\beta_1$ -AR abhängigen Signaltransduktionsweg
2. Die Langzeitbetablockade führt zu Veränderungen der invasiv gemessenen Hämodynamik nach 21 Tagen

3. Die Langzeitbetablockade führt zu einer Reduktion der Herzinfarktgröße im akuten *in vivo* Herzinfarktmodell der Maus

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Tierhaltung und Versuchstiere**

Gemäß dem Tierschutzgesetz zu Versuchen an lebenden Tieren wurde ein Tierversuchsantrag gestellt und dieser von der Regierung Unterfranken in Würzburg unter dem Aktenzeichen 55.2-2531.01-11/10 genehmigt.

Vor der Durchführung der experimentellen Versuche wurden die Tiere in den Tierställen des Universitätsklinikums gehalten und mit fester Nahrung und Wasser ad libidum versorgt.

### **2.2 Langzeitbetablockade mittels osmotischer Pumpen**

#### **2.2.1 Funktion osmotischer Pumpen**

Die Australischen Wissenschaftler Rose und Nelson entwickelten schon 1955 Osmotikpumpen zur kontinuierlichen Pharmakonabgabe [140]. Mit Hilfe dieser osmotischen Pumpen (ALZET®) können pharmazeutische Wirkstoffe mit einer Freisetzungsrate von 0,11-10,0 µl/Stunde bis zu sechs Wochen verabreicht werden. Die Abgabe der Arzneimittel beruht auf der osmotischen Druckdifferenz zwischen dem salzhaltigen Innenraum der Pumpe und dem umgebenen Gewebe. Aufgrund der Osmolarität kann Wasser aus dem Gewebe durch eine semipermeable Membran in die salzhaltige Kammer der Pumpe einströmen. Das Salz verbleibt aufgrund der semipermeablen Membran im Innenraum. Das Wasser bewirkt eine Kompression der elastischen Zwischenwand des mit der Arznei gefüllten Reservoirs der Pumpe und der Wirkstoff kann kontrolliert und kontinuierlich heraustreten. Die äußere Membran der osmotischen Pumpe sorgt dafür, dass physikalische oder chemische Eigenschaften des Medikaments, beispielsweise große oder ionisierte Moleküle, keinen Einfluss auf die Abgabe haben und das Arzneimittel trotzdem kontinuierlich ausgestoßen werden kann.

## **2.2.2 Durchführung der Pumpenimplantation**

Für die Implantation der Pumpen wurden die Tiere mit Isofluran in Narkose gelegt. Danach erfolgte ein Hautschnitt unter streng sterilen Kautelen dorsal rechts am Rücken. Subkutan im Fettgewebe wurde eine Tasche präpariert und die Pumpe implantiert. Anschließend erfolgte zur Schließung des Hautschnittes eine Naht mit einem monofilen, nicht resorbierbaren Faden.

In den Versuchen wurden von ALZET® osmotische Pumpen (Typ 1004, Durect Corporation, Cupertino, CA, USA) mit einer Freisetzungsrate von 0,11 µl pro Stunde über 21 Tage gewählt, wobei die Pumpen laut Herstellerangaben bis zu sechs Wochen verbleiben können. Für die Versuche wurden die Mäuse in zwei Gruppen eingeteilt: Die erste Gruppe erhielt gewichtsadaptiert den Betablocker Metoprolol mit 10 mg/kg KG und die Kontrollgruppe 0,9%iges NaCl.

## **2.2.3 Narkose und Beatmung**

Für die invasive Blutdruckmessung mittels linksventrikulärem Conductance-Katheter, die Organentnahmen für die molekularbiologische Auswertung und die Infarktinduktion wurden die Mäuse in Narkose gelegt. Die Tiere erhielten zur Einleitung der Narkose eine intraperitoneale Injektion von 0,06 mg/g KG Natrium-Pentobarbital (1,9 ml Pentobarbital, Merial, Hallbergmoos). Mit Hilfe des Fußwegzieh-Reflexes durch Druck auf den Zehenzwischenraum wurde die Anästhesietiefe überprüft und gegebenenfalls 0,015 mg/g KG Natrium-Pentobarbital verabreicht.

Für die Intubation wurden die Mäuse in Rückenlage auf einer Wärmeplatte (TKM-0902, Fohr Medical Instruments GmbH, Seeheim) fixiert und der Hals überstreckt. Mit Hilfe eines anal gesetzten Messfühlers (Fohr Medical Instruments GmbH, Seeheim) konnte die Aufrechterhaltung der Körpertemperatur von 37°C überprüft werden. Der Ober- und Unterkiefer wurde mit einer Péan-Klemme (BD312R, Aesculap, B. Braun AG, Melsungen) auseinander gehalten, sodass die Intubation mit einem 22-G-Venenverweilkatheter (B. Braun AG, Melsungen) erfolgen konnte. Die korrekte Lage des Tubus wurde anhand der Thoraxbewegungen überprüft. Die

Beatmung erfolgte druckkontrolliert bei einer Wassersäule von 32-34mm und 50% Sauerstoff und 50% Raumluft (SAR-830/p-Ventilator, CWE, Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim) Die Extremitäten wurden jeweils mit Elektroden zur Aufzeichnung des EKGs (Föhr Medical Instruments, Seeheim) versehen.

### **2.2.4 Protokoll zur invasiven Hämodynamik**

#### **2.2.4.1 Hämodynamische Messung mit Conductance-Katheters**

Das Druck-Volumen-Diagramm gibt Aufschluss über die Hämodynamik des Herzens. Mittels eines Conductance-Katheters wird im linken Ventrikel das systolische und diastolische Druck-Volumen-Verhältnis in Echtzeit gemessen. Daraus lassen sich die Herzleistung, der Auswurfanteil sowie das Schlagvolumen ableiten. Diese Methode wird eingesetzt bei Herzfehlermodellen oder bei Tieren, die während eines Experiments pharmakologisch beziehungsweise toxikologisch beeinflusst werden, um Veränderungen der Herzleistung festzustellen. Der Conductance-Katheter ist zur Zeit die verlässlichste und auf Grund der Weiterentwicklung im Bereich der Miniatursensoren die am häufigsten angewendete Methode seit der 1990er Jahre auch bei Nagetieren [141].

#### **2.2.4.2 Funktion des Conductance-Katheters**

Die Technik beruht auf der Messung der Leitfähigkeit des Blutes (Konduktanz) woraus das Volumen des linken Ventrikels bestimmt werden kann.

Der Katheter besteht aus einem Sensor, der entweder bei geschlossenem Thorax über die Arteria Carotis oder bei offenem Thorax über die Herzspitze eingeführt wird. Der Vorteil des geschlossenen Vorgehens besteht aus dem weniger invasiven Vorgehen und der daraus resultierenden höheren Stabilität der Tiere über einen längeren Zeitraum, beispielsweise einer Arzneimittelgabe während eines Versuches. Zudem ist der arterielle Druck über die Arteria Carotis leichter zu bestimmen. Nachteile gegenüber der offenen, invasiveren Methode ergeben sich bei extremer Hypertonie, Arteriosklerose oder Verkalkung der Aortenklappe [142].

Zusätzlich werden vier Elektroden verwendet, die paarweise ober- und unterhalb des Sensors angebracht werden. Es fließt ein konstanter Strom und es entsteht ein elektrisches Feld an den beiden äußeren Elektroden. An den inneren Elektroden wird eine Potenzialdifferenz aufgezeichnet und damit die Konduktanz gemessen. Da jedoch auch das umliegende Gewebe eine Konduktanz aufweist, muss das reale Blutvolumen mit Hilfe einer Kalibrierung errechnet werden. Die Formel zur Berechnung des intrakavitären Volumens lautet

$$V = 1/\alpha (\rho L^2)(G - G_p).$$

Hierbei ist  $\alpha$  der Volumenkalibrationsfaktor,  $\rho$  der elektrische Widerstand des Blutes,  $L$  die Distanz zwischen den Elektroden,  $G$  die gesamte Konduktanz und  $G_p$  die parallele Konduktanz des umgebenen Gewebes [143].

Zur Ermittlung des intrakavitären Volumens wird eine Infusion mit hypertoner Kochsalzlösung angelegt, die unter gleichbleibendem Volumen im Ventrikel die parallele Konduktanz des umgebenen Gewebes misst. Subtrahiert man diesen Wert von der gesamten Konduktanz, erhält man das intraventrikuläre Blutvolumen [142].

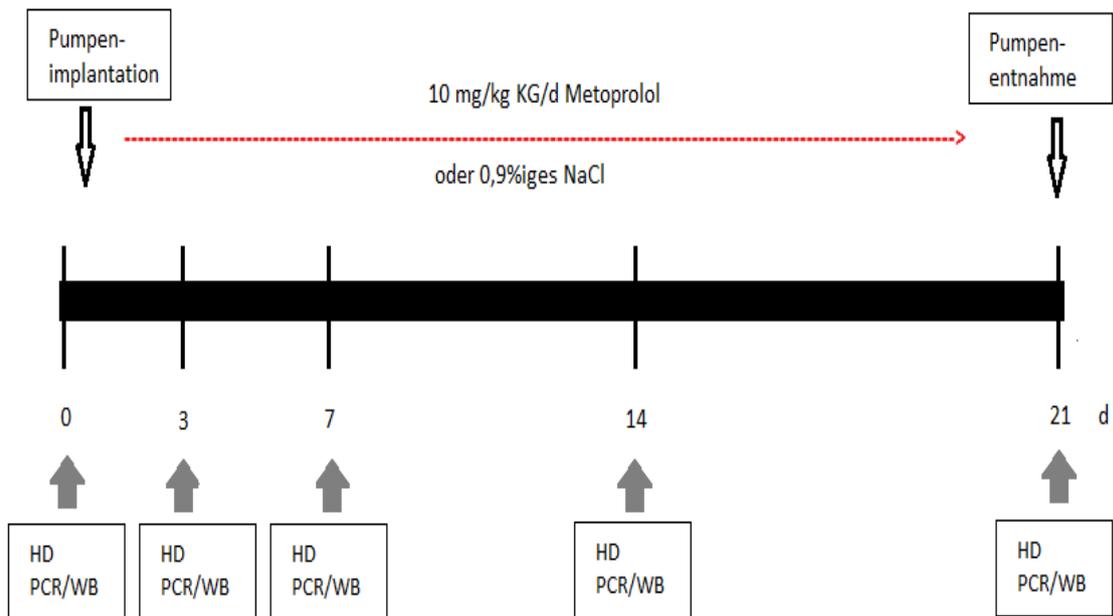
### **2.2.4.3 Durchführung der Katheterisierung**

Für die Messung mit Hilfe des Conductance-Katheters wurden insgesamt 16 Tiere randomisiert in eine Kontrollgruppe mit sieben Tieren und in eine Metoprololgruppe mit neun Tieren eingeteilt. Unter dem Mikroskop (OPMI-9-FC, Carl Zeiss, Jena) erfolgte ein Längsschnitt von ventral vom Os hyoideum bis zum Manubrium sterni. Die rechte Arteria carotis communis wurde in einer Länge von 2 cm unter Schonung des Nervus vagus und der umliegenden Strukturen freipräpariert und dargestellt. Vor Einführung des Conductance-Katheter (AD Instruments, Castle Hill, US; Millar Instruments Inc., Houston, Tx, USA) wurde das kraniale und kaudale Ende des freipräparierten Anteils der Arterie mittels Seidenfaden kurzzeitig okkludiert, um den Blutfluss zu unterbinden. Mittels Federschere (FD242R, Aesculap, B. Braun AG, Melsungen) wurde die Arteria carotis communis punktiert, damit der Katheter

eingeführt und retrograd über die Aorta bis in den linken Ventrikel vorgeschoben werden konnte. Zur Lagesicherung wurde der Katheter an zwei Seidenfäden befestigt. Die Präparation und Punktion der Vena jugularis für den Polyethylen(PE)-Katheter (0,28-0,96 mm PE-Schlauch Hartenstein, Würzburg) zur kontinuierlichen Volumenapplikation (20 µl/g KG/h) mit Elektrolytlösung (Sterofundin, B. Braun AG, Melsungen) erfolgte in gleicher Weise. Anschließend wurde der Hautschnitt mit einem monofilen nicht resorbierbaren Faden (5.0 Prolene, Ethicon inc. Somerville, NJ, USA) und Einzelknopfnähten verschlossen.

### **2.2.5 Protokoll zur Organentnahme für molekularbiologische Untersuchungen**

Die Pumpenimplantation, Narkose und Monitoring erfolgten wie bei dem Protokoll zur invasiven Hämodynamik. 20 Tiere wurden randomisiert in fünf Gruppen mit jeweils vier Tieren eingeteilt. Die Organentnahmen für die Molekularbiologie wurden jeweils nach 0, 3, 7, 14 und 21 Tagen durchgeführt. Es erfolgte eine Thorakotomie im 4. Interkostalraum links und die Darstellung des Herzens. Die Herzen wurden zügig entnommen und in einer auf Eis stehenden Schale mit gekühltem 0,9%igen NaCl gewaschen. Anschließend wurden die Vorhöfe und die Ventrikel voneinander separiert. Für die Auswertung wurde nur der linke Ventrikel herangezogen. Diese wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) mit flüssigem Stickstoff gegeben und bis zur molekularbiologischen Untersuchung bei -80°C schockgefroren.



**Abbildung 4: Graphische Darstellung des LTBB TC Modells an der Maus:**

d (Tage); HD (Hämodynamik); PCR (engl. polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion); WB (Western Blot)

### 2.2.6 Protokoll des in vivo Ischämie/Reperfusionsmodells

#### 2.2.6.1 Infarktinduktion

Für die Infarktinduktion und die anschließende IS-Bestimmung wurde das Protokoll modifiziert. 14 Tiere wurden randomisiert in zwei Gruppen eingeteilt, wobei acht Tiere der Kontrollgruppe und sechs Tiere der Metoprololgruppe angehörten. Alle Tiere erhielten über 21 Tage den Betablocker oder 0,9%iges NaCl. Pumpenimplantation, Narkose und Monitoring erfolgten wie bei der Durchführung der hämodynamischen Messung. Es erfolgte keine invasive Messung der Hämodynamik mittels Conductance-Katheter - der arterielle Druck wurde mittels PE-Katheter in der Arteria carotis communis (0,58-0,96 PE-Schlauch, Hartenstein, Würzburg, Druckwandler: Combitrans, B. Braun AG, Melsungen) bestimmt. Das Vorgehen entsprach analog der Katheterisierung der Vena jugularis zur Aufrechterhaltung der Flüssigkeitshomöostase.

Es wurde eine Thorakotomie links im vierten Interkostalraum vorgenommen und das Herz dargestellt. Anschließend folgte die stumpfe Eröffnung des Perikards.

Ein prominenter Ast der linken Koronararterie, welcher der LAD (engl. left anterior ascending) entspricht, wurde aufgesucht und mittig zwischen Herzspitze und -basis mit einem chirurgischen Faden (6/0 Perma-Hand® Seide, Ethicon inc, Somerville, USA) umschlungen. Durch einen Silikonschlauch, der als Okkluder diente, wurden beide Fadenenden gezogen. Somit konnte eine Okklusion der Arterie erreicht werden. Nach 30 Minuten der Baseline wurde die LAD reversibel für 45 Minuten okkludiert. Anschließend erfolgte die 180-minütige Reperfusion (Abbildung 5).

Durch die Applikation von zwei hängenden Gewichten an dem Faden, wurde die Okklusion durch den Zug der Gewichte erreicht. Dabei verblasste das durch den LAD versorgte Areal und im EKG war eine ST-Streckenhebung zu verbuchen. Durch das Lösen der Gewichte konnte die Reperfusion nach 45 Minuten der Okklusion gewährleistet werden. Es war eine Hyperämie des Myokards und ein Rückgang der ST-Streckenhebung im EKG zu beobachten.



Abbildung 5: Schematische Darstellung des Gesamtprotokolls der LTBB und Infarktinduktion an der Maus

### 2.2.6.2 Infarktgrößenbestimmung

Um die IS zu bestimmen, wurde zunächst der LAD erneut okkludiert und über den Zugang der Arteria carotis communis 0,7 ml Heparin mit 500 IE/ml (25 000IE, Ratiopharm GmbH, Ulm) und 0,5 ml Patentblau (0,1 g/ml; Sigma-Aldrich; St.Louis, MO, USA) verabreicht. Das nicht von der Ischämie betroffene Areal stellt sich als blau gefärbt dar, das ischämische Areal stellt sich als blass dar.

Anschließend wurde eine letale Dosis von Natrium-Pentobarbital intraperitoneal appliziert.

Zuerst wurden die Vorhöfe separiert und danach beide Ventrikel voneinander getrennt. Der linke Ventrikel wurde für 25 Minuten bei -25°C gefroren und anschließend von der Basis zur Spitze in fünf bis sieben Scheiben mit einer Dicke von 1 mm geschnitten. Um das noch vitale Risikoareal (AAR, engl. area at risk) von dem ischämischen Gewebe zu unterscheiden, wurden die separierten Anteile für 25 Minuten in Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC, 100 mg TTC/l in Phosphatpuffer, pH 7,4; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, St.Louis, MO, USA) gegeben. Daraufhin wurde das Gewebe für zwölf Stunden in 3,5%igem Formaldehyd gelegt. TTC wird mit Hilfe von oxidativen Enzymen zu Formazan reduziert, welches dann rötlich erscheint. Somit kann vitales vom nekrotischen Myokardgewebe, welches sich als grauweiß darstellt, unterschieden werden.

Darauffolgend konnte die gravito-planimetrische Auswertung erfolgen. Dazu wurde jeder Schnitt fotografiert (Finepix S3 Pro, Fujifilm, Tokyo, Japan; Blitz: Sigma Ringblitz EM 140 DG NA-ITTL) und gewogen. Mit Hilfe eines Computerprogrammes (Adobe Photoshop 8.0.1, Adobe Systems Inc, San Jose, CA, USA) konnte die AAR (ist die Summe aus vitalem und irreversibel infarziertem Areal) und die IS gemessen werden. Die IS versteht sich als Prozentwert von der AAR. Die Tiere, bei denen der Anteil der AAR unter 15% von der Gesamtmasse des linken Ventrikels lag, wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Ferner unberücksichtigt in Bezug auf die Auswertung blieben Tiere, die während des Experiments unter Kammerflimmern oder linksventrikulärem Pumpversagen litten.

## **2.3 Molekularbiologische Auswertung**

### **2.3.1 Herstellung der Lysate**

Um die Lysate herzustellen, wurde zunächst der linke Ventrikel in die dem Mörser zugehörige Glasröhre gegeben. Zusätzlich wurde 750 µl RIPA-Puffer hinzugegeben. Der RIPA-Puffer wurde zuvor mit Proteaseinhibitoren (Complete

Protease Inhibitor Cocktail Ultra Tablets mini; Roche, Mannheim) und für phosphorylierte Proteine mit Phosphataseinhibitoren (phosStOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets; Roche, Mannheim) versetzt. Die Glasröhre wurde zur Kühlung des Ventrikels in ein 150-ml-Becherglas mit Eis gestellt und im Homogenisator (IKA ®RW 14 basic) bei 800 rpm für zweimal 30 Sekunden homogenisiert. Mit Hilfe einer Glaspipette wurde das Homogenisat in ein 1,5-ml-Mikroreaktionsgefäß (Safe Seal; Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf) gefüllt. Die Probe wurde in die auf 4°C gekühlte Zentrifuge (Eppendorf 5418R; Wesseling-Berzdorf) für fünf Minuten bei 11.600 rpm gegeben. Der durch das Zentrifugieren entstandene Überstand wurde mit einer 1000 µl-Pipette (Research; Eppendorf, Hamburg) abgenommen und in ein Mikroreaktionsgefäß gefüllt, das verbliebene Pellet wurde verworfen. Die Probe wurde bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C eingefroren.

### RIPA-Puffer:

0,5 ml	Igepal CA-630 (1%)
0,25 g	Sodium deoxycholate (0.5%)
0,05 g	SDS (0,1%)
49,5 ml	PBS

### **2.3.2 Proteinbestimmung**

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte mit Hilfe der BCA-Methode. Diese Methode basiert auf der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  (Kupfer) zu  $\text{Cu}^+$  mittels Proteine in alkalischem Milieu.  $\text{Cu}^+$  bildet einen purpurfarbenen Komplex mit der Bicinchoninsäure (BSA), dessen Absorption photometrisch bestimmt werden kann. Das Absorptionsmaximum liegt bei 562 nm.

Um eine Eichkurve als Standard zu erstellen, wurde eine Verdünnungsreihe mit bekannter Endkonzentration von 2000 µg/ml bis 25 µg/ml aus einer BSA-Stocklösung (Albumin Standard, Pierce®; Rockford, IL, USA) hergestellt. Als Verdünnungslösung diente RIPA-Puffer (s.o.). Die Verdünnungsreihe wurde

doppelt in 96-well-Mikrotestplatten aufgetragen. Die noch freien wells dienten der Auftragung der zu bestimmenden Probe, der ebenfalls RIPA-Puffer in einer Verdünnung von 1:10 zugesetzt wurde. Danach folgte die Zugabe der BCA-working Reagenz A und B (Pierce®; Rockford, IL, USA) mit einer Multipipette in alle zuvor befüllten Wells. Vor dem 30-minütigen Inkubieren bei 37°C im Inkubator, wurde die Mikrotestplatte für drei Minuten auf den Schüttler gestellt.

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Mikrotestplatte in ein Messgerät (sunrise, TECAN; Crailsheim) gestellt und mit Hilfe des Programmes „Magellan“ die Extinktion gemessen. Die Proteinkonzentration ergibt sich aus dem Vergleich der unbekannt Probe mit der Verdünnungsreihe bekannter Proteinkonzentration. Damit die Proben für die nachfolgende Elektrophorese geeigneter und auch haltbarer werden, wurde ihnen vierfacher Lämmli-puffer mit 6 %  $\beta$ -Mercaptoethanol zugesetzt. Diese Verdünnung musste allerdings bei der Proteinkonzentrationsbestimmung berücksichtigt und umgerechnet werden.

### **2.3.3 Elektrophorese**

Das SDS-Page-Elektrophoreseverfahren diente dazu, Proteine nach ihrer Molekülgröße aufzutrennen.

Vor dem Gießen des Gels wurden die Glasplatte mit integriertem Abstandshalter von 1,5 mm (Bio-Rad Laboratories GmbH; München) und die plane Glasplatte (Bio-Rad Laboratories GmbH; München) mit 70%igem Alkohol gereinigt. Die plane Glasplatte wurde über den Abstandshalter der anderen Glasplatte gelegt, so dass innen ein Raum für das Gel entstand. Beide Platten wurden in einen speziellen Gelrahmen (Bio-Rad Laboratories GmbH; München) hineingeschoben und in einem Gießstand (Bio-Rad Laboratories GmbH; München) befestigt.

Als erstes wurde das gegossene 10%ige Trenngel bis circa 1,5 cm unterhalb der planen Glasplatte eingefüllt. Der freibleibende Platz diente für das später gegossene Sammelgel und wurde für die 20-minütige Polymerisierung des Trenngels vorsichtig mit destilliertem Wasser überschichtet. Nachdem das Trenngel ausgehärtet war, wurde das überschichtete Wasser abgegossen und

ein 1,5 mm-Kamm mit 15 Geltaschen (Bio-Rad Laboratories GmbH; München) ebenfalls mit 70%igem Alkohol gereinigt und bereitgelegt. Das angesetzte Sammelgel wurde eingebracht und der Kamm hineingeschoben. Nach weiteren 20 Minuten war auch das Sammelgel auspolymerisiert.

Der Gießstand und der spezielle Gelrahmen konnten entfernt und die Glasplatten mit dem polymerisierten Gel in die Elektrophoresekammer (Mini-PROTEAN® 3 Cell, Bio-Rad Laboratories GmbH; München) eingebaut werden. Nachdem der Elektrophoresepuffer in die innere und äußere Kammer gefüllt wurde, konnte der Kamm aus dem Sammelgel entfernt werden. Um eventuelle Gelreste aus den Taschen zu entfernen, erfolgte eine Durchspülung der Geltaschen mit einer 1000 µl-Pipette (Research; Eppendorf, Hamburg).

Um einen Größenvergleich der Proteine nach der Auftrennung zu erhalten, wurde in die erste und letzte Tasche des Gels 1,5 µl Proteinmarker (Protein-Marker V, PEQLAB Biotechnologie; Erlangen) gegeben. So konnte die Molekülgröße des gesuchten Proteins leicht abgelesen werden. Die Probengemische wurden aus dem -80°C-Kühlschrank auf Eis aufgetaut. Mit Hilfe der zuvor durchgeführten Messung der Proteinkonzentration (s. Kapitel 2.3.2 ) wurde die Menge an Probe für 40 µg Protein ermittelt und mit 0.5-20 µl-Pipettenspitzen (Biosphere® Filter Tips, Sarstedt; Nümbrecht-Rommelsdorf) in ein Mikroreaktionsgefäß (Safe Seal 1,5 ml, Sarstedt; Nümbrecht-Rommelsdorf) gegeben. Dieses wurde für fünf Minuten bei 95°C in einen Wärmeblock (TECHNE Dri-Block® DB 2A; Cambridge, UK) zur Denaturierung gestellt und nachfolgend für drei Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert (Eppendorf 5418R; Wesseling-Berzdorf). Nachdem die Proben in die Geltaschen pipettiert wurden, wurde die Elektrophoresekammer an die Spannungsquelle (peq Power 300, PEQLAB Biotechnologie; Erlangen) unter Berücksichtigung der Polung bei 60 Volt für 15 Minuten angeschlossen. Als die Proben das Sammelgel verlassen hatten, konnte die Spannungsquelle auf 90 Volt hochgestellt werden. Hatte die Proteinfront das untere Ende des Gels erreicht, wurde die Auftrennung der Proteine in der Elektrophorese beendet.

### Trenngel (10%):

4 ml	H <sub>2</sub> O
2,5 ml	3M TRIS pH 8,8
100 µl	SDS (10%)
3,33 ml	Acrylamid/Bis (30:2) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
100 µl	APS (10%)
10 µl	TEMED (Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe)

### Sammelgel:

2,85 ml	H <sub>2</sub> O
1,25 ml	0,5M TRIS pH 6,8
50 µl	SDS (10%)
850 µl	Acrylamid/Bis (30:2) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
50 µl	APS (10%)
5 µl	TEMED (Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe)

### Elektrophoresepuffer (10fach):

60,4 g	Tris (Tris ultrapure AppliChem GmbH; Darmstadt)
288 g	Glycine (Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe)
20 g	SDS
Auf 2 Liter mit H <sub>2</sub> O auffüllen	

### **2.3.4 Western Blot**

Es wurde das semidry Blotverfahren verwendet, um die Proteine auf die Nitrocellulosemembran (whatman®; Dassel) zu transferieren. Dazu wurden die Nitrocellulosemembran und das Blotting-Papier auf Gelgröße zugeschnitten und im Transferpuffer eingeweicht. Mit einem speziellen Glasheber (Bio-Rad Laboratories GmbH; München) wurde die plane Glasplatte abgehoben und die Taschen des Sammelgels abgetrennt. Im Anschluss konnte das Gel unter

Ausschluss von Luftblasen auf die im Transferpuffer schon benetzte Membran gegeben werden. Die Nitrozellulosemembran mitsamt Gel wurde im Semidry-Blot (Biometra; Göttingen) auf das ebenfalls im Transferpuffer getränkte Blotting-Papier gelegt. Oben auf das Gel wurde ein weiteres auf Gelgröße zugeschnittenes Blotting-Papier gegeben und das Gerät mit einem Deckel verschlossen. Der Semidry-Blot wurde an die Spannungsquelle für 90 Minuten bei 15 Volt angeschlossen.

Nach dem Proteintransfer auf die Membran konnten das Gel mitsamt Papier verworfen werden und mit Hilfe des Proteinmarkers die Banden markiert werden, auf deren Höhe das gesuchte Protein und die Ladungskontrolle zu erwarten waren.

Zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen diente vor der Antikörperinkubation das Blocken. Dazu wurde die Nitrozellulosemembran für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer Lösung mit 5% Milchpulver (Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe) und TBS-Tween auf dem Schüttler geblockt.

### Transferpuffer (10fach):

117 g Glycine (Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe)  
211 g Tris (Tris ultrapure AppliChem GmbH; Darmstadt)  
auf 4 Liter mit H<sub>2</sub>O auffüllen

### TBS-Tween (10fach):

84,798 g Tris (Tris ultrapure AppliChem GmbH; Darmstadt)  
63,62 g NaCl  
auf 4 Liter H<sub>2</sub>O auffüllen  
mit HCl auf pH 7,6 titrieren

## **2.3.5 Antikörper**

Für die Inkubation der Trägermembran mit den Primärantikörpern wurde eine 0.5%ige BSA-Lösung hergestellt (Albumin from bovine serum, Sigma-Aldrich;

Steinheim). Die Antikörper wurden in den jeweiligen Konzentrationen zu der BSA-Lösung hinzugegeben und in eine Plastikfolie luftblasenfrei eingeschweißt (Vacupack plus, Krups GmbH; Offenbach). Die Inkubation erfolgte über Nacht auf einem Schüttler in einer Kühlkammer bei 4°C.

### Primärantikörper:

Kaninchen-anti-Beta1-Rezeptor ( $\beta_1$ -AR) (Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, Ca, USA)

1:200

Kaninchen-anti-Phospholamban (PLM) (Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, Ca, USA)

1:100

Kaninchen-anti-p-Phospholamban (Ser16) (Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, Ca, USA)

1:100

Kaninchen-anti-p-Phospholamban (Thr17) (Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, Ca, USA)

1:100

Maus-anti-Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) (Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, Ca, USA)

1:2000

Nach der Inkubation wurde die Nitrozellulosemembran aus der Folie entnommen und jeweils dreimal für etwa zehn Minuten unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur mit TBS-Tween gewaschen, um unspezifisch gebundene Primärantikörper von der Membran zu entfernen.

Die Sekundärantikörper, die das Enzym Meerrettich-Peroxidase (horseradish, HRP) für die spätere Detektion gebunden haben, sind spezifisch gegen den Fc-Teil der Primärantikörper gerichtet. Die Zweitantikörper wurden in 2,5% Milchpulver (Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe) und 2,5% BSA (Albumin

from bovine serum, Sigma-Aldrich; Steinheim) mit TBS-Tween gegeben und die Membran für circa eine Stunde auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert.

### Sekundärantikörper:

Anti-Kaninchen IgG (GE Healthcare; Freiburg) 1:5000

Anti-Maus IgG (GE Healthcare; Freiburg) 1:5000

Anschließend erfolgte erneut ein dreimaliges Waschen der Membran für jeweils zehn Minuten mit TBS-Tween.

### **2.3.6 Entwicklung**

Der Detektion liegt das Verfahren der Chemolumineszenz zugrunde. Die Chemolumineszenzreaktion wird durch das an den Sekundärantikörper gebundene Enzym HRP katalysiert, das eine Oxidation des Luminols auslöst. Die entstehende Lumineszenz kann dann detektiert werden.

Die ECL-Detektionsreagenz wurde zu gleichen Teilen in ein Kunststoffröhrchen (Cellstar® tubes, Greiner Bio-One GmbH; Frickenhausen) pipettiert und für eine Minute auf die Membran gegeben. Danach erfolgte die Belichtung für 30, 60 und 120 Sekunden in der Kammer des Entwicklers (FluorChem Multimage II, Biozym Scientific GmbH; Hessisch Oldendorf).

### ECL I

1 Cap	Luminol
1 Cap	PCA
5 ml	1M Tris, pH 8,5
auf 50 ml mit H <sub>2</sub> O auffüllen	

### ECL II:

5 ml	1M Tris, pH 8,5
32 µl	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
auf 50 ml mit H <sub>2</sub> O auffüllen	

### **2.3.7 Herstellung der Lysate und RNA-Isolierung**

Für die Herstellung der Lysate wurden die rechten Ventrikel verwendet und in einem Glashomogenisator mit 350 µl RA1-Lyse-Puffer (RNA Kit, Macherey-Nagel) vermengt. Das Homogenisieren wurde bei 1000 rpm etwa 20 Mal durchgeführt und die Proben mit einer Glaspipette in ein 1,5 ml-Cup überführt. Unter dem Abzug fand die Zugabe von 3,5 µl β-Mercapto-Ethanol (Sigma Aldrich) statt. Nach dem Zentrifugieren für eine Minute bei 11000 g wurde zu jedem Lysat 350 µl 70%iger Ethanol hinzugefügt und in einen NucleoSpin-Filter überführt. Damit sich die RNA an die NucleoSpin-Säule bindet, wurde nochmals für eine Minute bei 11000 g zentrifugiert. Die Säule wurde auf ein neues Cap gesetzt und das Eluat verworfen. Zum Entsalzen der Membran wurde 350 µl MDB-Puffer (Macherey-Nagel) hinzugegeben und erneut für eine Minute bei 11000 g zentrifugiert. 95 µl eines DNase-Mixes wurde auf die Säule pipettiert und für 15 Minuten die DNA bei Raumtemperatur verdaut. Das erste Waschen der Membran erfolgte mit 200 µl RA2-Puffer (Macherey-Nagel) zur Inaktivierung der DNA, danach wurde die Membran für 30 Sekunden bei 11000 g zentrifugiert. Vor dem zweiten Waschgang wurde 600 µl RA3-Puffer hinzugegeben und nochmals 30 Sekunden zentrifugiert. Im letzten Waschgang erfolgte die Beimengung von 250 µl RA3-Puffer und eine Zentrifugation bei 11000 g über zwei Minuten. Für das Auswaschen der RNA wurden beim ersten Mal 30 µl nukleasefreies Wasser pipettiert und nach einer Wartezeit von 60 Sekunden für eine Minute zentrifugiert. Beim zweiten Mal wurden 20 µl nukleasefreies Wasser auf die Säule gegeben, 60 Sekunden gewartet und abschließend zentrifugiert.

### **2.3.8 cDNA-Synthese**

Für die Herstellung der cDNA wurde der High Capacity Archive Kit (Applied Biosystems, Darmstadt) verwendet. Die benötigte RNA-Menge betrug 130 ng. Um die Konzentration an RNA in ng/µl der Proben zu bestimmen, wurde zuvor eine RNA-Konzentrationsbestimmung mittels Spektrophotometer (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific) durchgeführt. Die photometrisch errechnete RNA-Menge wurde in PCR-Caps pipettiert und mit der

entsprechenden Menge an nukleasefreiem Wasser aufgefüllt, sodass ein Endvolumen von 10 µl erreicht wurde. Zu den Proben wurde jeweils 10 µl des Master-Mixes gegeben. Nach dem Vortexen und Zentrifugieren wurden die Proben in den PCR-Thermal-Cycler (Thermal Cycler 2720, Applied Biosystems) gelegt. Die Inkubation begann mit 25°C für zehn Minuten, während der Synthese 37°C für 120 Minuten und zum Abbruch der Synthese für fünf Minuten bei 85°C. Zum Abschluss wurden die Proben mit 45 µl nukleasefreiem Wasser auf 65 µl verdünnt.

### Master-Mix:

-	10x RT-Puffer	2 µl
-	25x dNTP-Mix	0,8 µl
-	Reverse Transkriptase	1 µl
-	RNase- Inhibitor	1 µl
-	nukleasefreies H <sub>2</sub> O	3,2 µl

### **2.3.9 Quantitative real-time PCR**

Der Vorteil der quantitativen real-time PCR (qRT-PCR) besteht darin, dass die Menge der amplifizierten DNA in jedem Zyklus gemessen werden kann. Dazu wird eine DNA-Polymerase (TaqMan-Sonde) benötigt, an deren 5'-Ende eine Fluoreszenz angehängt ist. Der Farbstoff (FAM) lagert sich in die DNA ein und man kann mit Hilfe des Fluoreszenzsignals die quantitative Menge an DNA bestimmen. Die Proben wurden im Triplet gemessen (drei wells für jede cDNA-Probe) und als endogene Kontrolle diente 18S-RNA (18S ribosomale Ribonukleinsäure), um Ungleichheiten in der DNA-Menge auszugleichen. Es wurde eine 96-well-Platte (ABgene SuperPlate 96 well PCR Plates, Thermo Scientific) verwendet und in jedes zu messende well wurde ein Master-Mix bestehend aus 12,5 µl QPCR-Rox-Mix (Thermo Scientific), 6 µl nukleasefreies H<sub>2</sub>O und 1,5 µl der FAM-Sonde (Applied Biosystems, Darmstadt) pipettiert. Für die endogene Kontrolle, die ebenfalls für jede Probe erstellt wurde, wurde anstatt der FAM-Sonde 1,5 µl 18s-RNA-Sonde verwendet. Zu den Master-

Mixes wurden jeweils 5 µl der zu bestimmenden vorverdünnten cDNA-Probe pipettiert. Anschließend wurden die Platten mit Folie dicht verschlossen und für ca. 10 Sekunden zentrifugiert. Für die qRT-PCR wurden die Platten in den Thermo Cycler (7300 Real Time PCR System, Applied Biosystems) gestellt und zunächst die Temperatur für 15 Minuten auf 90°C erhöht, damit die Enzyme aktiviert werden. Es folgen 60 Zyklen und danach wird die Temperatur auf 60°C eingestellt. Nach Ablauf des Programmes wurde die relative Quantifizierung mittels Ct-Methode errechnet und ausgewertet. Der Ct-Wert gibt an, bei welchem Zyklus das erste Fluoreszenzsignal erscheint. Somit entspricht ein kleiner Ct-Wert für eine hohe Genexpression.

## 2.4 Statistische Auswertung

Die Parameter der Hämodynamik und das EKG wurden analog-digital mit dem Konverter (Data Translation<sup>TM</sup>, Marlboro, USA) und der Software (Notocord<sup>®</sup> hem 3.5, Croissy sur Seine, France) aufgezeichnet.

Die sich ergebenden Banden aus den molekularbiologischen Untersuchungen wurden eingescannt (Epson Perfection, Epson, Meerbusch, Deutschland), um die Signalintensität densitometrisch zu messen (ScanPack3.0, Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen). Für die Normalisierung der Intensität diente die Ladekontrolle. Dazu wurde von der jeweiligen Ladekontrolle ein Quotient aus der Signalintensität des jeweiligen Proteins und der Kontrolle errechnet. Die Analyse erfolgte mit Excel (Microsoft Corporation, USA).

Die statistische Analyse der invasiven Hämodynamik erfolgte mittels one-way Anova. Die Varianzanalyse wurde zunächst unter Baselinebedingungen erhoben. Hierbei erfolgte der Vergleich innerhalb der Gruppen (Baseline vs. Metoprolol und Baseline vs. NaCl) und zwischen den Gruppen (Baseline NaCl vs. Baseline Metoprolol). Daraufhin erfolgte die Analyse in gleicher Weise mit Dobutaminstimulation innerhalb der Gruppen (Dobutamin vs. Metoprolol und Dobutamin vs. NaCl) und zwischen den Gruppen (Dobutamin Metoprolol vs. Dobutamin NaCl). Da weniger als drei Gruppen für die Baseline- und Dobutaminbedingungen vorhanden waren, erfolgten keine Post-Hoc-Tests.

Die Varianzanalyse der Molekularbiologie wurde ebenfalls mit one-way/two-way Anova durchgeführt. Zunächst wurden alle Werte der verschiedenen Messzeitpunkte innerhalb einer Gruppe mit der Baseline (Tag 0) verglichen (Baseline vs. Metoprolol Tag 3 vs. Metoprolol Tag 7 vs. Metoprolol Tag 14 vs. Metoprolol Tag 21). Anschließend erfolgte der Vergleich zwischen den Gruppen zu den entsprechenden Messzeitpunkten. Falls sich eine Signifikanz ergab, wurde der one-way Post-Hoc Duncan's Test angewendet. Bei der Bestimmung der AAR und der Infarktgröße im Verhältnis zur AAR wurde ebenso vorgegangen und sowohl zwischen den Gruppen (Kontrolle vs. Metoprolol) und innerhalb der Gruppen analysiert. Der Post-Hoc Duncan's Test wurde im Falle

einer Signifikanz herangezogen. Die Datenerhebung wurde mit Hilfe einer Statistiksoftware (StatMost 3.6 für Windows™, Dataxiom Software Inc., Los Angeles, USA) vorgenommen.

Daten waren signifikant bei  $p < 0,05$ . Alle Daten sind Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung.

### 3 Ergebnisse

Es wurden insgesamt 50 Mäuse für die Durchführung der Experimente herangezogen. Dabei wurden 14 Tiere für die Bestimmung der Infarktgröße instrumentiert, zusätzlich wurden 20 Mäusen die Herzen für die molekularbiologischen Untersuchungen entnommen. 16 Mäuse dienten der Durchführung der Conductance-Messungen für die invasive Hämodynamik.

#### 3.1 Hämodynamik

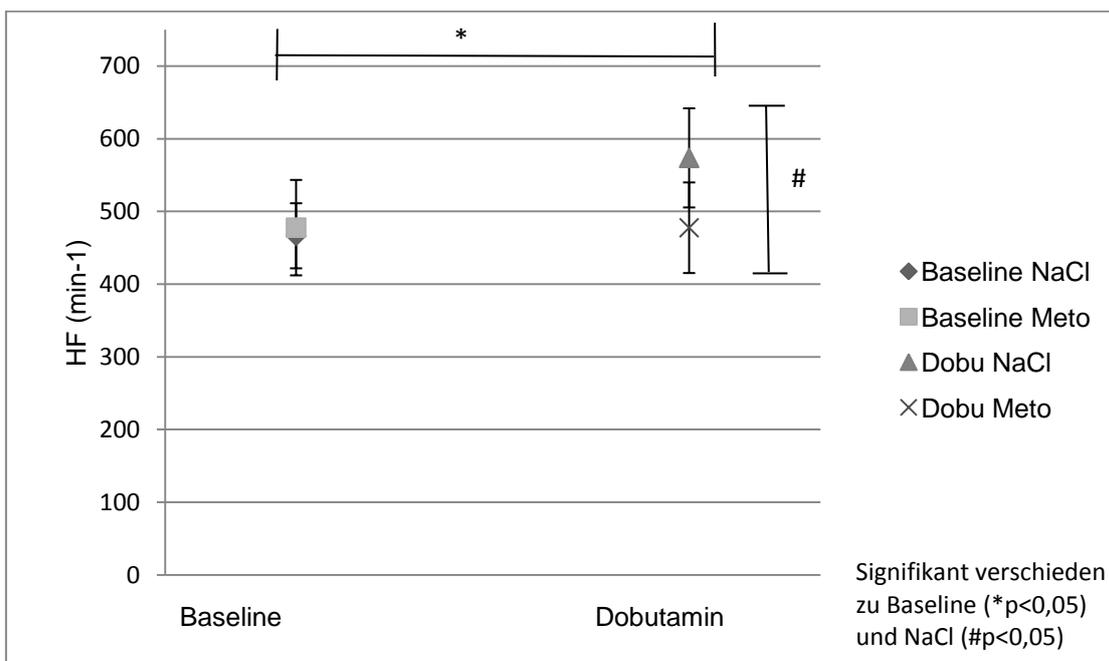
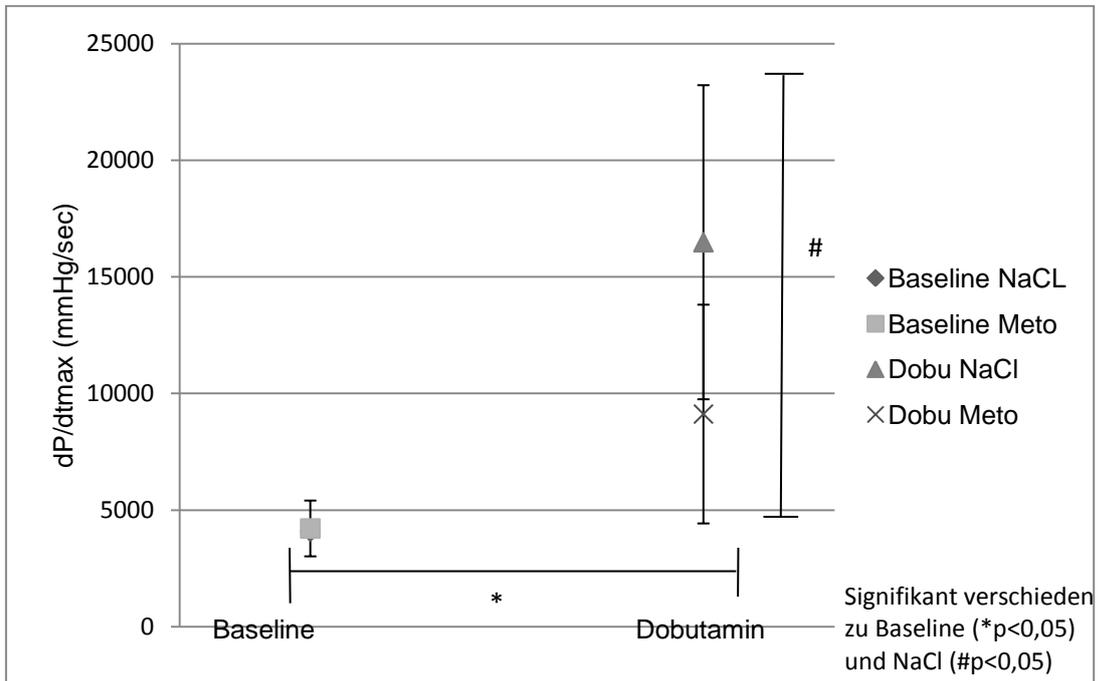


Abbildung 6: HF in den linksventrikulären Conductance-Messungen

n= 7 (NaCl), n=9 (Meto); Daten sind Mittelwert  $\pm$  SD

Während der Baseline waren keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen zu verzeichnen. Die Herzfrequenz (HF) blieb unter Metoprolol konstant, die Kontrollgruppe wies einen Anstieg der HF von 460 auf 575 min<sup>-1</sup> auf (Abbildung 6).

## Ergebnisse



**Abbildung 7: Kontraktilität in den linksventrikulären Conductance-Messungen**

n= 7 (NaCl), n=9 (Meto); Daten sind Mittelwert  $\pm$  SD

Während der Baseline waren keine Unterschiede in der Kontraktilität in der Metoprolol- und Kontrollgruppe zu beobachten. Der Anstieg der Kontraktilität war unter Dobutamin-Stimulation in der Metoprololgruppe verringert, aber auch signifikant verschieden zu Baseline-Bedingungen (Abbildung 7).

### 3.2 Infarktgröße

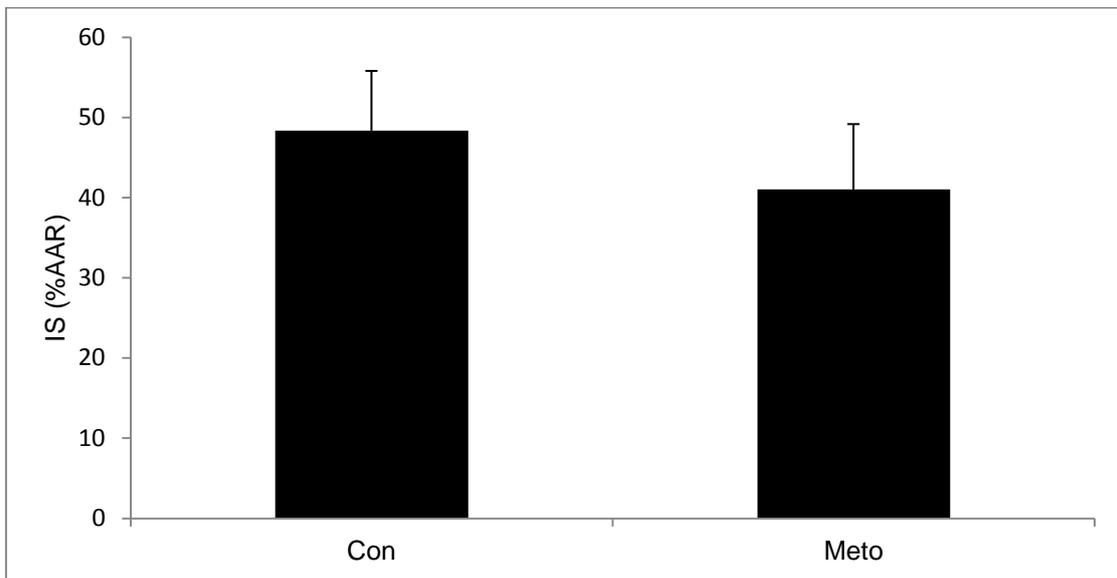


Abbildung 8: IS als Anteil der AAR (in %), LTBB:

CON (Kontrollgruppe); Meto (Metoprololgruppe), n= 8 (CON), 6 (Meto); Daten sind Mittelwert ± SD

Die IS wurde als Anteil in Prozent von der AAR dargestellt. Die IS der Kontrollgruppe betrug 49±8%. Die Applikation von Metoprolol zeigte keinen Effekt auf die Herzinfarktgröße, welche in dieser Gruppe bei 41±8% lag (Abbildung 8).

### 3.3 Ergebnisse der Molekularbiologie mit Western Blot

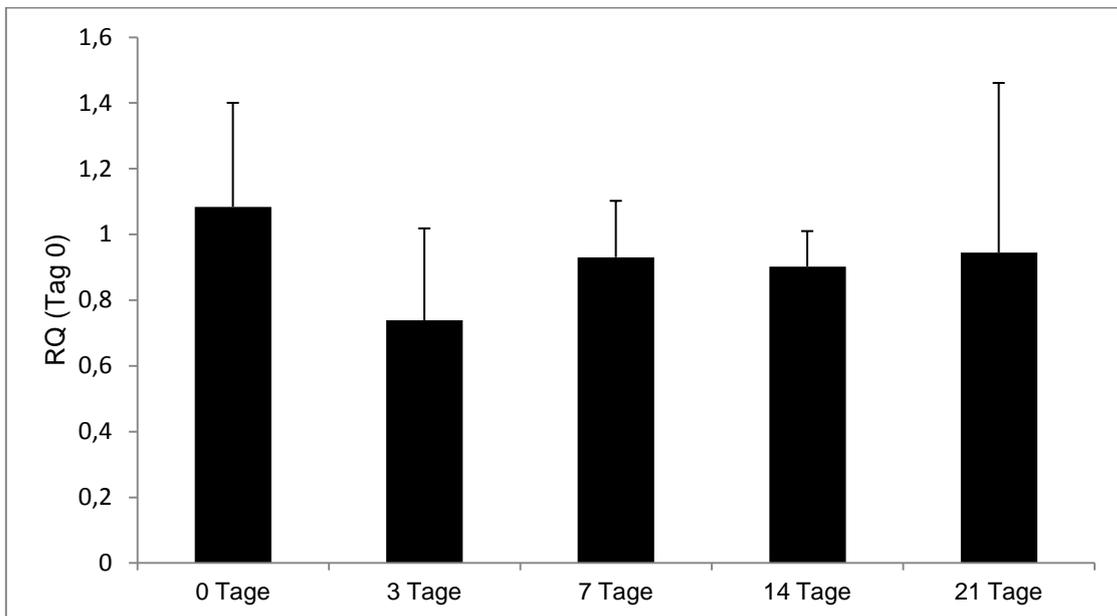


Abbildung 9: WB  $\beta_1$ -AR TC

n=4 pro Erhebungstag, Daten sind Mittelwert  $\pm$  SD

Bei den Ergebnissen des Western Blots blieb die Proteinkonzentration von  $\beta_1$ -AR im Zeitverlauf nahezu konstant. Die Proteinexpression von  $\beta_1$ -AR nahm am Tag drei verglichen mit der Kontrollgruppe ab. Ab dem siebten Tag ist eine Zunahme zu Tag 3 zu verzeichnen, die Konzentration liegt etwas unterhalb des Kontrollwertes. Dieser Wert veränderte sich bis Tag 21 kaum. Die Proteinkonzentration liegt nach 21 Tagen leicht unterhalb der Baseline-Bedingungen (Abbildung 9).

### 3.4 Ergebnisse der Molekularbiologie mit real-time PCR

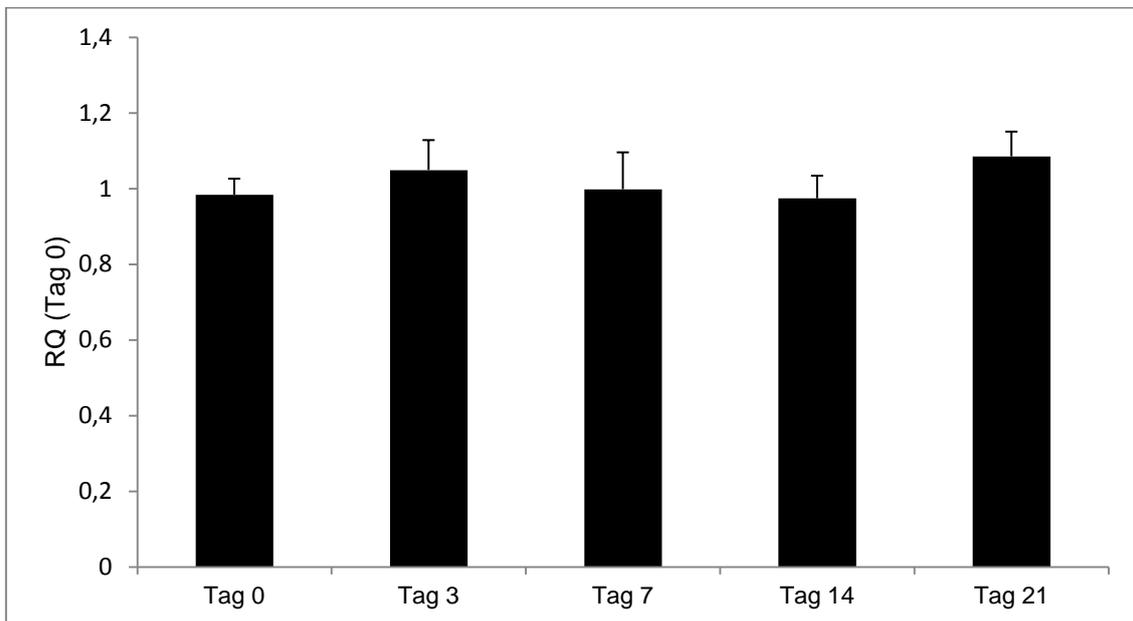


Abbildung 10: PCR  $G_{nas\_TC}$

n=4 pro Erhebungstag, Daten sind Mittelwert  $\pm$  SD

Die mRNA-Expression von  $G_{nas}$  stieg an Tag 3 verglichen mit der Baseline an. An Tag 7 war die die mRNA in Bezug auf den Kontrollwert erhöht und nach 14 Tagen vergleichbar mit den Ausgangswerten. An Tag 21 konnte ein Anstieg der mRNA von  $G_{nas}$  unter Betablockade mit Metoprolol verglichen mit der Kontrollgruppe festgestellt werden (Abbildung 10).

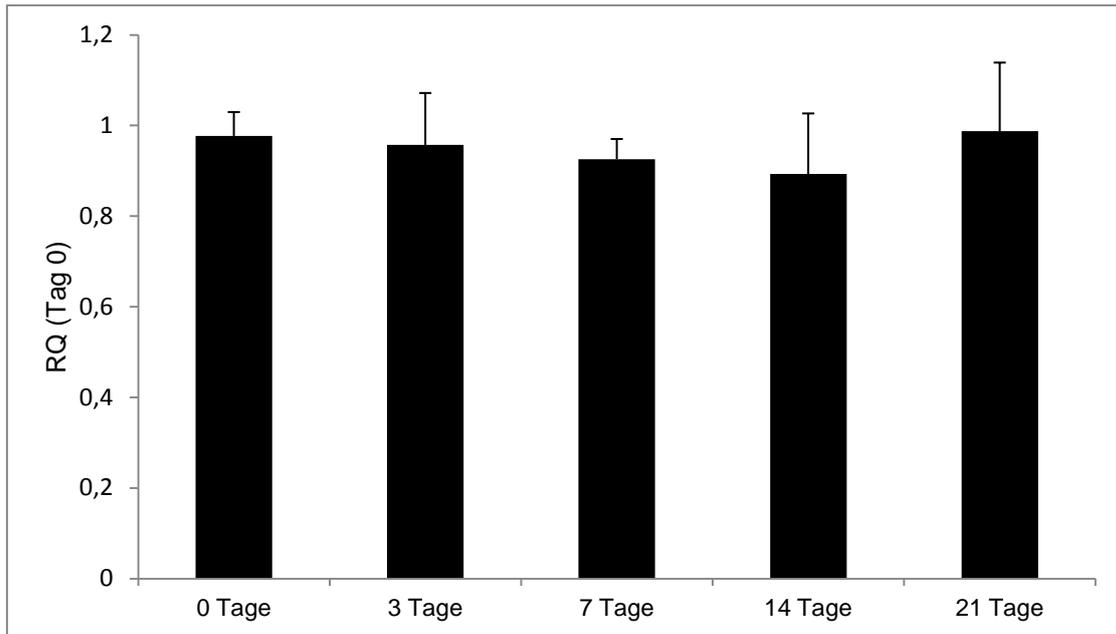


Abbildung 11: PCR Arrb1 TC

n=4 pro Erhebungstag, Daten sind Mittelwert  $\pm$  SD

Unter Metoprololverabreichung blieb die Expression der mRNA von Arrb1 nahezu konstant. Ein Rückgang der mRNA war an Tag 7 und 14 zu beobachten. Nach 21 Tagen war der Wert vergleichbar mit der Kontrollgruppe (Abbildung 11).

## Ergebnisse

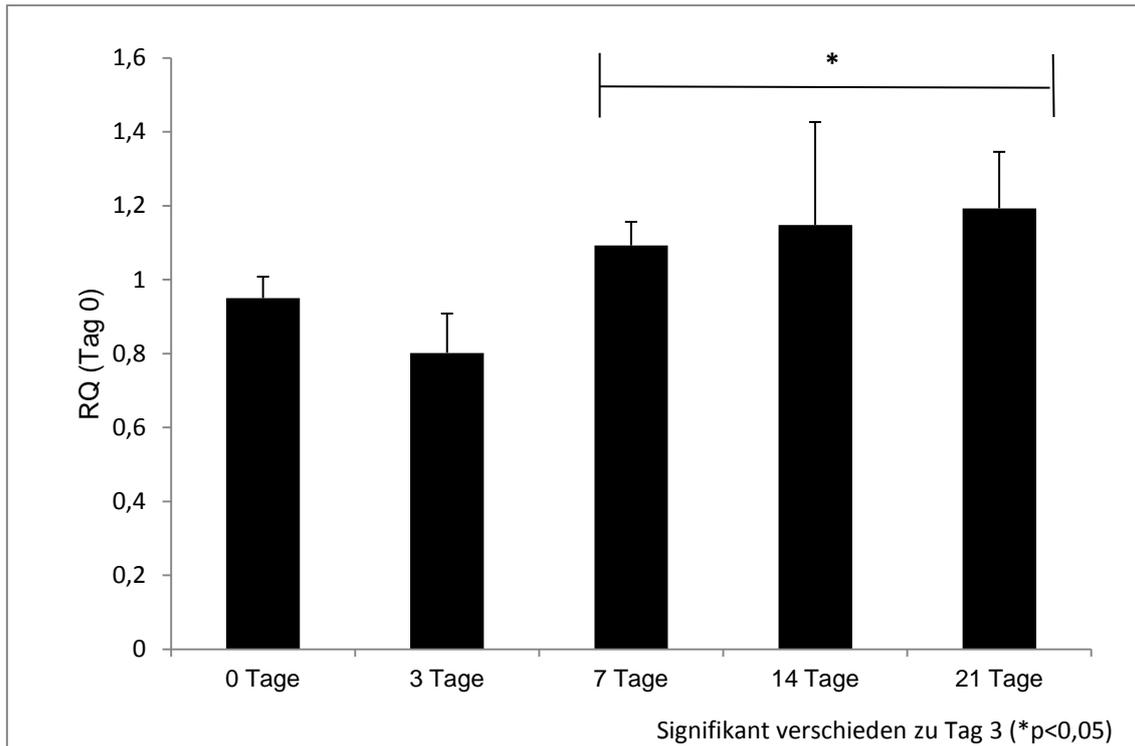


Abbildung 12: PCR  $\beta_1$ -AR TC

n=4 pro Erhebungstag, Daten sind Mittelwert  $\pm$  SD

Die PCR-Analysen ergaben, dass die mRNA von  $\beta_1$ -AR nach drei Tagen der Metoprololgabe verringert war. An Tag 7 lag die Expression über dem Kontrollwert. An Tag 14 und 21 konnte eine stetig ansteigende Expression der mRNA gegenüber Baseline-Bedingungen konstatiert werden (Abbildung 12).

## 4 Diskussion

Eine wichtige Aufgabe der  $\beta$ -Rezeptoren im Herzen ist die Regulation der Chronotropie, Inotropie und Lusitropie unter Katecholaminstimulation [144]. Der  $\beta_1$ -AR koppelt an  $G_s$ -Proteine, wohingegen der  $\beta_2$ -AR zusätzlich auch  $G_i$ -proteingekoppelt sein kann und dadurch kardioprotektive Eigenschaften aufweist [107, 112].

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe von subkutan implantierten Pumpen eine *in vivo* Langzeitbetablockade an der Maus etabliert und charakterisiert, welche zur weiteren Erforschung des IRI und der Kardioprotektion dienen soll.

### 4.1 Transkriptionelle und translationelle Veränderungen des $\beta_1$ -AR durch eine Langzeitbetablockade

In der vorliegenden Arbeit konnte eine erhöhte Transkription der mRNA von  $\beta_1$ -AR bei gleichbleibender Proteinkonzentration nach 21 Tagen der Betablockade unter Metoprolol nachgewiesen werden.

Eine langanhaltende, chronische Stimulierung des Betarezeptors wie sie bei Herzerkrankungen, MI oder nach kardialen Operationen auftritt, hat negative Folgen [127]. Es kommt zu einer Desensibilisierung des  $\beta_1$ -AR, bei der eine erhöhte Konzentration von Katecholaminen im Plasma festgestellt wurde [145, 146]. Dieses Phänomen wird auch agonistinduzierte Desensibilisierung genannt. Im Zuge einer langanhaltenden Stimulation des  $\beta_1$ -AR bei Herzinsuffizienz und der damit im Zusammenhang stehenden Desensibilisierung des Rezeptors, ist eine Herabregulation und Verminderung der Dichte des Rezeptors festzustellen [132]. Diese Herabregulation geht mit einer verringerten Expression mRNA einher [147]. Zu den Folgen auf Rezeptorebene zählen die Internalisierung oder die Spaltung des Rezeptors bzw. des Proteinkomplexes. Ebenso können Proteine betroffen sein, die Veränderungen im Signaltransduktionsweg des Rezeptors hervorrufen [148]. Eine Ursache dieser Veränderungen ist die

Phosphorylierung durch verschiedene Kinasen. Als Beispiele seien hier die PKA, PKC und GRK genannt [149]. Um einer Progression der Erkrankung und der schädlichen Auswirkungen einer erhöhten Katecholaminkonzentration im Plasma entgegenzuwirken, wurden Betablocker zur Therapie entwickelt [136]. Diese haben eine Überexpression des Rezeptors zur Folge, die die Desensitisierung kompensieren sollten. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass in diesem *in vivo* Maus-Modell keine Dichteprüfungen durchgeführt wurden. Ob durch die Betablockade in dieser Arbeit eine Erhöhung der Dichte stattgefunden hat, wäre mit weiteren Versuchen mittels Radiorezeptorassay nach Scatchard abzuklären. Heilbrunn et al. konnten bei Anwendung von sechsmonatiger Betablockerapplikation eine Zunahme der Dichte der  $\beta_1$ -AR und ein verbessertes Ansprechen auf Katecholamine in einer klinischen Studie zeigen [133]. Diese Ergebnisse stehen mit denen dieser Arbeit in Einklang. So konnte eine erhöhte mRNA-Expression für  $\beta_1$ -AR festgestellt werden, was für eine Heraufregulation des Rezeptors unter Betablockertherapie spricht.

Bei den WB Versuchen ergaben sich jedoch keine erhöhten Proteinkonzentrationen für  $\beta_1$ -AR. Dafür kommen verschiedene Gründe wie beispielsweise eine Internalisierung des  $\beta_1$ -AR über Clathrin, eine Sequestration bzw. ein schneller Abbau des  $\beta_1$ -AR in Frage [150, 151]. Auch eine Umschaltung des Signalweges wäre denkbar [136]. Es könnte auch sein, dass die Metoprololgabe über 21 Tage in diesen Versuchen nicht ausreichend war, um auf der Proteinebene eine Erhöhung festzustellen. Es wäre also möglich, dass dies erst nach sechs Monaten der Therapie eintritt. Ob jedoch eine ansteigende Expression von Clathrin vorliegt, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht und wäre Gegenstand weiterer Untersuchungen. Die Sequestration und der schnelle Abbau des  $\beta_1$ -AR können Ursache der strengen Regulation des  $\beta_1$ -AR sein. Da es sich in diesem Modell um gesunde Mäuse ohne Herzinsuffizienz handelt, ist davon auszugehen, dass vor der Pumpenimplantation keine Desensitisierung stattgefunden hat. Durch die Betablockade kommt es aber zu einer Hochregulation des  $\beta_1$ -AR, die jedoch bei gesunden Tieren nicht benötigt wird, um eine Desensitisierung zu kompensieren. Folglich könnte eine Sequestration stattgefunden haben, die den

$\beta_1$ -AR entweder in den Lysosomen wieder abbaut oder bei Bedarf, beispielsweise im Zuge einer Resensibilisierung, in die Zellmembran einbaut [151]. Beweise für eine Internalisierung oder Sequestration des  $\beta_1$ -AR wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen geliefert. Lefkowitz et al. zeigten, dass Arrb1 bei der Internalisierung des  $\beta$ -AR eine entscheidende Rolle einnimmt. Somit wird G-proteinunabhängig, über die ERK, der Rezeptor phosphoryliert und Arrb1 rekrutiert, welches anschließend die Internalisation des  $\beta_1$ -AR verursacht [152]. Auch Shiina et al. belegten, dass Arrb1 über Clathrin die Internalisierung des Rezeptors vermittelt [150]. Zudem wurde belegt, dass nicht nur die  $\beta_1$ -AR-Dichte unter selektiver  $\beta_1$ -AR-Blockertherapie zunimmt, sondern auch eine Sensibilisierung von  $\beta_2$ -AR stattfindet, die eine erhöhte Ansprechbarkeit auf Katecholamine zur Folge hat [136]. Daraus folgt, dass durch die Langzeitmetoprololgabe eine Kardioprotektion erzielt werden kann, da durch langanhaltende  $\beta_2$ -Rezeptorstimulation von dem  $G_s$ -abhängigen Signaltransduktionsweg auf die kardioprotektive  $G_i$ -abhängige Signalkaskade umgeschaltet wird. Diese bewirkt über die Aktivierung der PKB und ERK eine antiapoptotische Wirkung, da die Öffnung der mPTP-Kanäle verhindert wird [113]. Die erhöhte mRNA-Expression von  $\beta_1$ -AR und die gleichbleibende Proteinkonzentration in den Ergebnissen dieser Arbeit stünde mit den oben genannten Beobachtungen in Einklang.

In den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit sind die mRNA-Konzentrationen von  $G_{nas}$  und Arrb1 nach 21tägiger Metoprololgabe unverändert geblieben. Eine Erklärung hierfür könnte ebenfalls die Umschaltung von dem  $G_s$ - auf den  $G_i$ -abhängigen Signaltransduktionsweg liefern. Da  $G_{nas}$  die  $\alpha$ -Untereinheit des  $G_s$ -Proteins darstellt, ist vermutlich deren erhöhte Expression nicht notwendig, da vermehrt die Untereinheiten des  $G_i$ -Proteins benötigt werden. Ob deren Expression unter Langzeitbetablockade ansteigt, bleibt fraglich und wäre Gegenstand weiterer Untersuchungen. Eine vermehrte Transkription von Arrb1 findet beim G-protein biased Signalweg nicht statt, da die Umschaltung auf den  $G_i$ -proteinabhängigen Signalweg die Aktivierung von ERK und PI3K erfordert. In weiterführenden Versuchen wäre mittels PCR abzuklären, ob hierfür eine erhöhte Transkription vorliegt. Bohm et al. zeigten, dass bei Herzinsuffizienz die

Konzentration des  $G_i$ -Proteins ansteigt und  $G_{nas}$  unverändert bleibt [153]. Auch in Versuchen am menschlichen Myokard wurde bewiesen, dass der  $\beta_2$ -AR an das  $G_i$ -Protein koppelt [154]. Somit ist davon auszugehen, dass am Menschen ebenfalls eine Umschaltung auf den  $G_i$ -Signaltransduktionsweg stattfindet.

Es besteht außerdem die Möglichkeit, dass antiapoptotische Wirkungen  $G$ -Proteinunabhängig ablaufen, da der  $\beta_1$ -AR mittels Transaktivierung über Arrb1 die ERK aktiviert [114]. Der erste Schritt der  $G$ -proteinunabhängigen Signalkaskade ist die Phosphorylierung des  $\beta_1$ -AR durch die GRK. Dadurch wird das zytosolische Protein Arrestin rekrutiert, welches die Bindung des heterotrimeren  $G$ -Proteins vom Rezeptor löst [155]. Gegen diese Annahme spricht allerdings, dass in diesem Experiment ein Anstieg der mRNA-Expression von Arrb1 ausbleibt. Eine mögliche Erklärung ist jedoch, dass für die  $G$ -proteinunabhängige Signalkaskade das  $\beta$ -Arrestin 2 (Arrb2) ursächlich ist oder aber, dass auch nach 21 Tagen der Blockade noch keine Veränderungen in der mRNA-Expression für Arrb1 nachweisbar sind [114]. Um diese Annahme bestätigen zu können, müssen noch weitere molekularbiologische Untersuchungen zu Arrb1 und Arrb2 erfolgen. Auch Ungerer et al. konnten keine Erhöhung der mRNA für Arrb1 im linken Ventrikel beim Menschen mit Herzinsuffizienz verglichen mit gesunden Patienten feststellen [156]. Für die Annahme, dass eine dreiwöchige Betablockade nicht ausreichend war, um eine erhöhte Arrb1-mRNA-Expression nachzuweisen spricht, dass die Arrb1-Isoform hauptsächlich für die Desensibilisierung des  $\beta$ -AR verantwortlich ist [157]. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse dieser vorliegenden Arbeit gilt jedoch die Umschaltung auf die kardioprotektive  $G_i$ -Signalkaskade als wahrscheinlich.

## **4.2 Beeinflussung der Physiologie/Hämodynamik nach Langzeitbetablockade**

Bei den Conductance-Messungen der Langzeitbetablockade war unter Dobutaminstimulation ein geringerer Anstieg der linksventrikulären Kontraktilität im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellbar.

PLM spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation der SERCA und damit bei der Kontraktilität des Herzens. Die cAMP-abhängige Phosphorylierung des PLM hat eine erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in das SR zur Folge und demnach wird auch eine vermehrte Menge von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR freigesetzt was wiederum zu einer erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Zytosol führt [158]. Durch Metoprolol wird jedoch die Phosphorylierung verhindert und es entstehen positive Effekte in Bezug auf die Kalziumhomöostase der Kardiomyozyten, da unphosphoryliertes PLM als Inhibitor der SERCA fungiert [159]. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den Ergebnissen zur Physiologie dieser Arbeit. Es wurde gezeigt, dass eine erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Zytosol eine wichtige Stellung bei der Entstehung des IRI einnimmt und ein Zusammenhang zwischen der Menge des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  und des Ausmaßes des IRI besteht [160]. So kann durch Metoprolol eine Kardioprotektion erzielt werden, indem die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration gesenkt werden kann.

Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt kann nicht nur cAMP- und PKAabhängig beeinflusst werden, sondern auch durch die CaMK II. Die CaMK II $\delta$  gilt als die vorherrschende Isoform im Herzen [161]. Der CaMK II Signalweg wird nach  $\beta_1$ -AR-Stimulation aktiviert und die CamK II phosphoryliert PLM, Ryanodinrezeptoren und sarkolemmale L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle [110]. Durch die Phosphorylierung wird die Öffnungswahrscheinlichkeit erhöht und es resultiert ein Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  [162]. Dieser Anstieg ist bei Herzinsuffizienz und bei IRI charakteristisch. Es konnte gezeigt werden, dass eine andauernde Aktivierung der CamK II proapoptisch wirkt und deren Blockade die  $\beta_1$ -AR-vermittelte Apoptose verhindert [111, 163]. In diesem Zusammenhang demonstrierten Wang et al., dass nach anhaltender  $\beta_1$ -AR-Stimulierung eine zeitlich abhängige Umschaltung der PKA-Signalkaskade auf den CamK II Signaltransduktionsweg erfolgt [163]. Welcher Signalweg in den hier durchgeführten Versuchen hauptsächlich durch Metoprolol geblockt wurde, ist nicht genau zu sagen. Hierfür müssen weitere molekularbiologische Untersuchungen zur PKA und zur CaMK II $\delta$  durchgeführt werden, um Veränderungen auf transkriptioneller oder translationeller Ebene festzustellen. Entsprechend der Ergebnisse von Wang et al. ist es jedoch wahrscheinlich, dass zunächst die Inhibition der PKA-

abhängigen Signaltransduktion und darauffolgend die der CaMK II zur Verminderung des linksventrikulären Druckanstieges geführt hat.

Die Senkung der HF unter der Gabe des Betablockers Metoprolol in dieser Arbeit konnte auch die Arbeitsgruppe um Murray et al. bestätigen. Diese zeigten ebenfalls bei Patienten nach akutem MI unter Betalangzeitblockade, dass die HF permanent gesenkt werden konnte [164]. Positive Effekte in Bezug auf die Hämodynamik am Menschen konnte auch eine weitere Arbeitsgruppe nach sechsmonatiger Betablockade verbuchen [165]. Hier muss allerdings berücksichtigt werden, dass die Blockade mit Atenolol und Nebivolol durchgeführt wurde und die Patienten vor Beginn der Therapie eine Herzinsuffizienz aufwiesen. In weiteren Untersuchungen muss abgeklärt werden, ob eine Blockade mit Metoprolol am Menschen einen ähnlichen Effekt hervorrufen würde.

### **4.3 Beeinflussung der Herzinfarktgröße durch eine Langzeitbetablockade**

Eine signifikante Reduzierung der IS fand in der vorliegenden unter Langzeitblockade mit Metoprolol nicht statt.

Dass die Verabreichung von Betablockern bei Risikopatienten einen kardioprotektiven Effekt herbeiführt, konnte in zahlreichen experimentellen [166, 167] und klinischen Studien [124, 168] belegt werden. Schon 1977 demonstrierten Rasmussen et al. an einer tierexperimentellen Studie mit Hunden, dass die Gabe von Propranolol die IS reduziert. Der Betablocker wurde allerdings nicht zur Langzeittherapie verwendet, sondern entweder unmittelbar vor und während der Koronararterienokklusion oder drei Stunden nach der Okklusion gegeben. Bei Verabreichung vor und während der Ischämie konnte bei den Tieren eine Reduktion der IS festgestellt werden, die Applikation nach Eintritt des Ischämieereignisses ergab eine geringere, aber dennoch signifikante Verringerung verglichen mit der Placebogruppe [169]. Auch Burmeister et al. bestätigten dieses Phänomen bei Hunden, zusätzlich auch für

die Betablocker Atenolol und Nadolol [170]. Ferner wurden in einer klinischen Studie Patienten innerhalb der ersten vier Stunden nach Auftreten von Symptomen eines akuten MI mit Timolol therapiert und eine IS-Reduktion belegt [171]. Ebenso zeigte der Betablocker Metoprolol *in vitro* positive Effekte bezüglich des IRI, indem es die Chemotaxis der NG und die Generierung von ROS inhibiert [172].

Dass durch die Langzeitbetablockade mit Metoprolol in diesen experimentellen Versuchen eine tendenzielle, jedoch keine signifikante IS-Reduktion erzielt wurde, kann damit zusammenhängen, dass dafür eine zuvor länger andauernde intakte  $\beta_1$ -AR-Signaltransduktion notwendig ist. Tong et al. untermauern diese Annahme, indem sie herausfanden, dass eine initiale  $G_s$ -abhängige Aktivierung der PKA notwendig ist. Die PKA phosphoryliert daraufhin den  $\beta_2$ -AR, der dann auf die antiapoptotisch wirksame  $G_i$ -Signalkaskade umschaltet [173]. Ferner bestätigten Frances et al., dass eine kurzzeitige Stimulation des  $\beta_1$ -AR mit Isoproterenol vor dem Ischämieereignis das Ausmaß des IRI vermindert, indem es die Freisetzung der Kreatinkinase vermindert und die linksventrikuläre Funktion verbessert [174]. Zu berücksichtigen ist hierbei jedoch, dass die kurzzeitige Applikation von  $\beta$ -Blockern am Tier erfolgte und die jetzige klinische Situation - wegen des erhöhten Risikos an einem Apoplex zu erkranken - von der kurzfristigen Gabe eines Betablockers absieht [125].

Außerdem muss in Betracht gezogen werden, dass der  $\beta_1$ -AR-Signaltransduktionsweg möglicherweise eine duale Rolle spielt. Zum einen löst dessen Blockade während der Ischämie- und Reperfusionphase kardioprotektive Effekte aus, zum anderen erfolgt die Vermittlung der IPC und APC zum Teil über den  $\beta_1$ -AR. Diese Theorie wird dadurch bekräftigt, dass die IPC und APC durch Blockade des Rezeptors während der Konditionierung abgeschwächt oder aufgehoben wird [67, 86]. So stehen die Ergebnisse dieser Arbeit mit denen von Spear et al. in Einklang, indem sie gleichfalls herausfanden, dass nur eine Betablockade während der Ischämie- und Reperfusionphase und nicht eine zusätzliche langanhaltende Blockade schon während der IPC das Risiko für eine Gewebsnekrose minimiert und somit

protektiv wirkt. Dies könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, dass eine Langzeitbetablockade vor dem Ischämieereignis eine signifikante Verminderung der IS verhindert.

Solenkova et al. zeigten, dass die Kardioprotektion während der Reperfusion erzielt wird und nicht während der Ischämiephase [175]. Einen weiteren Beleg dafür, dass die Kardioprotektion erst während der Reperfusionsphase eintritt, liefert eine Studie von Prabu et al. Es wurde nachgewiesen, dass die PKA-abhängige  $\beta_1$ -AR-Blockade in der Reperfusionsphase den IRI vermindert [120].

Der G-protein biased Signalweg über Arrb1 liefert eine weitere Erklärung für die tendenzielle, aber nicht signifikante Verringerung der IS. Die G-proteinunabhängige Kardioprotektion nach dreiwöchiger Betablockade zeichnet sich ab, ist hingegen nicht ausreichend für die Reduzierung der IS. Diese Feststellung steht in Kongruenz zu der noch nicht nachweisbaren Veränderung des Arrb1 auf transkriptioneller Ebene. Abgesehen von der möglicherweise zeitlich zu kurzen Betablockade, könnte Metoprolol eine geringere Ansprechbarkeit auf die Arrb1-Signaltransduktion haben. Für den Betablocker Carvedilol konnte eine hohe Stimulation und somit eine Aktivierung des kardioprotektiven, G-proteinunabhängigen Signalweg nachgewiesen werden [176]. Somit muss berücksichtigt werden, dass die verschiedenen Betablocker Signaltransduktionswege unterschiedlich stark stimulieren und beeinflussen. Aufgrund dieser Tatsache ist die Aussage unserer Studie, dass keine signifikante IS-Reduktion stattgefunden hat, limitiert durch die Anwendung des Betablockers Metoprolol. Eine interessante Anschlussstudie wäre die Betalangzeitblockade mit Carvedilol am Mausmodell, um möglicherweise eine Signifikanz in der Verminderung der IS zu erreichen.

Unsere Arbeitsgruppe fand zuvor heraus, dass die Kardioprotektion durch Metoprolol dosisabhängig ist. Erst ab einer Konzentration von 1,75 mg/kg KG wurde eine Reduktion der IS festgestellt [177]. In Anbetracht der Tatsache, dass in diesen aktuellen Untersuchungen eine Konzentration von 10 mg/kg KG täglich verabreicht wurden, ist es wahrscheinlich, dass eine zu geringe Dosis Metoprolol nicht ursächlich für die ausbleibende IS-Reduktion in dieser Arbeit

ist. Folglich spricht vieles dafür, dass erstens eine intakte  $\beta_1$ -AR-Signaltransduktion vor einer Ischämie- und Reperfusionsphase notwendig ist und zweitens Metoprolol eine zu geringe Wirkung auf den G-protein biased Signalweg hat, um die IS signifikant zu vermindern.

#### **4.4 Voraussetzung für Studie zur Anästhetika-induzierten Kardioprotektion und Übertragbarkeit auf den Menschen**

Zahlreiche klinische Studien belegen den kardioprotektiven Effekt einer Langzeitbetablockade bei Herzinsuffizienz. Durch die Behandlung mit Betablockern verringerte sich die Mortalität und es trat eine Verbesserung der kardialen Parameter ein [131, 178, 179]. Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits nachweisen, dass die kurzzeitige Betablockade in tierexperimentellen Versuchen die desfluraninduzierte APC abschwächt oder ganz aufhebt [177, 180]. Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit konnten die kardioprotektiven Effekte der Langzeitbetablockade an der Maus in Bezug auf die Molekularbiologie und Hämodynamik aufgezeigt werden. Da in der vorliegenden Studie keine signifikante Reduzierung der IS erreicht wurde, könnte in einer Anschlussstudie eine Postkonditionierung nach vorheriger dreiwöchiger Betalangszeitapplikation angewendet werden. Interessant wäre, ob die AIPOST unter Langzeitgabe ebenfalls zu einer Aufhebung der Kardioprotektion führt wie die APC unter Betakurzzeitapplikation oder, ob möglicherweise eine Reduzierung der IS erreicht werden kann. Ein anderer zu untersuchender Aspekt ist die Molekularbiologie unter einer AIPOST bei vorheriger Betablockade. Weiterhin könnten die Auswirkungen des Modells der Langzeitbetablockade auf die APC untersucht werden. Hinsichtlich der klinischen Anwendung ist die Postkonditionierung aufgrund des nicht vorhersehbaren Eintritts eines MI von Vorteil.

Das Tiermodell des IRI ist auf den Menschen bedingt übertragbar, man kann als Vergleich die Bypassoperation mit Anschluss an die HLM heranziehen, da hierbei ebenfalls eine kurzzeitige Okklusion durchgeführt wird. Am Tiermodell

konnten zahlreiche Studien den positiven Effekt von Betablockern nach einem Ischämieereignis belegen [13, 166, 167, 170]. Die präoperative, orale Gabe von Betablockern erzielte beim Menschen nach einer Bypassoperation keine Abschwächung der Desensibilisierung [181]. Es konnte jedoch bei der präoperativen kombinierten Verabreichung von Atenolol und Digitalis nach Anschluss an die HLM ein vermindertes Auftreten von Vorhofflimmern nachgewiesen werden [182]. Zudem wurde in einer anderen Studie mit der Applikation von Carvedilol und Metoprolol zehn Tage vor einer Bypassoperation mit HLM begonnen, wobei sich für Carvedilol eine effektivere Prävention von Vorhofflimmern ergab als für Metoprolol [183]. Es muss jedoch beachtet werden, dass in dieser Arbeit schon 21 Tage vor Beginn der Okklusion eine Metoprololgabe erfolgte, die nicht oral verabreicht wurde und, dass die Betablocker beim Menschen unterschiedlich agieren. Für Nebivolol fand man beispielsweise heraus, dass es die Hämodynamik stärker verbessert als Atenolol [165].

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch den eigentlich selektiven  $\beta_1$ -AR-Blocker Metoprolol nicht auch der  $\beta_2$ -AR teilweise blockiert wird. Für den  $\beta_2$ -AR wurde eine Kardioprotektion durch Verminderung der Apoptose nachgewiesen [121]. Falls nun der  $\beta_2$ -AR mit blockiert wird, könnte diese positive Wirkung zum Teil aufgehoben sein.

Bezüglich der Übertragbarkeit der Langzeitbetablockade vom Tiermodell auf den Menschen müssen zudem Komorbiditäten berücksichtigt werden. In diesem Langzeitbetablockademodell an der Maus wurden nur gesunde und junge Tiere verwendet. Im klinischen Alltag hingegen dominieren kardial vorgeschädigte, ältere Patienten, die eventuell noch weitere Begleiterkrankungen aufweisen. In der vorliegenden Studie konnte jedoch die Ko-Medikation mit dem  $\beta$ -Blocker Metoprolol getestet werden und die positiven Effekte hinsichtlich der Hämodynamik und Molekularbiologie dargestellt werden. Ob eine Kardioprotektion auch mit einer anderen Ko-Medikation stattfindet, wäre in weiteren Versuchen abzuklären. Als weitere Limitation der Übertragbarkeit muss in diesem Zusammenhang auf die möglichen genetischen

Veränderungen des  $\beta$ -AR beim Menschen hingewiesen werden. Beispielsweise durch Polymorphismen, hervorgerufen durch Umwelteinflüsse oder krankheitsbedingt, können die Wirkungen der Betablocker verändert oder abgeschwächt werden [184].

Dadurch, dass die kongestive Herzinsuffizienz in der westlichen Welt eine weit verbreitete Erkrankung ist, die mit Betablockern behandelt wird, ist diesem Therapeutikum eine bedeutende Rolle zuzuschreiben. Durch die Absenkung der HF und die negative inotrope Wirkung, verringern diese Pharmaka den Sauerstoffbedarf des Herzens. Zudem wird unter Betablockergabe die Phospholipase A inhibiert und die Akkumulation von Fettsäuren vermindert [185, 186].

Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten zukünftig einen Einfluss auf die Therapie von Risikopatienten mit einer chronischen Herzerkrankung haben. So wirkt sich eine Langzeitbetablockade positiv auf den Sauerstoffbedarf des Herzens aus, indem es negative chrono- und inotrope Effekte erzielt. Unter Berücksichtigung der Erkenntnisse aus der POISE-Studie sollte jedoch beachtet werden, dass die kurzfristige Gabe von Betablockern im perioperativem Umfeld nach jetzigem Wissensstand als kritisch zu betrachten ist, da für Patienten ein höheres Risiko besteht an einem Apoplex zu erkranken. Durch die festgestellten Veränderungen in der invasiven Hämodynamik und im  $\beta_1$ -AR abhängigen Signaltransduktionsweg kann dieses Modell als Langzeitbetablockade angesehen werden. Falls sich diese Ergebnisse auf den Menschen übertragen lassen, ist jedoch bei Eintritt eines MI eine zuvor begonnene Dauertherapie über 21 Tage mit Metoprolol nicht wirksam, die IS zu reduzieren.

## 5 Zusammenfassung

Nach einem akuten MI oder bei Herzinsuffizienz gelten Betablocker als Therapiemittel der Wahl. Durch die Hemmung des Sympathikus wirken sie so dem Überschuss an Katecholaminen entgegen und erzielen eine kardioprotektive Wirkung. Ziel dieser Arbeit war, ein Modell zur Langzeitbetablockade der Maus zu etablieren und molekularbiologisch zu charakterisieren, welches für die Erforschung des IRI und der Kardioprotektion durch Anästhetika-induzierte Konditionierung dienen soll. Die Betablockade mit Metoprolol erfolgte über 21 Tage mittels subkutan implantierten Pumpen. Neben der invasiven Messung der Hämodynamik wurde die Molekularbiologie der Proteine  $\beta_1$ -AR,  $G_{nas}$  und Arrb1 untersucht und die Herzinfarktgröße am *in vivo* Herzinfarktmodell der Maus bestimmt.

Es zeigte sich bei der invasiven Messung mittels Conductance-Katheter eine Verbesserung der linksventrikulären Kontraktilität und eine konstant bleibende Herzfrequenz unter Dobutaminstimulation während der Betablockade. Zudem ergab sich für  $\beta_1$ -AR eine erhöhte mRNA-Konzentration bei gleichbleibender Proteinkonzentration. Für  $G_{nas}$  und Arrb1 konnte in der molekularbiologischen Auswertung keine veränderte mRNA-Expression festgestellt werden. Die Herzinfarktgröße wurde unter Metoprololgabe nicht signifikant beeinflusst. Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass die Betablockade Veränderungen in der Molekularbiologie im untersuchten  $\beta_1$ -Signaltransduktionsweg hervorruft. Auch die invasive Messung mit Hilfe des Conductance-Katheters ergab die bei einer  $\beta_1$ -AR Blockade mit Metoprolol zu erwartenden positiven hämodynamischen Veränderungen.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde bestätigt, dass die Methode der invasiven Messung charakterisiert wurde und sich das Herzinfarktmodell der Betalangzeitblockade mit Metoprolol an der Maus etabliert hat. Dieses Modell kann für zukünftige Forschungen hinsichtlich der Anästhetika-induzierten Konditionierung und des IRI angewendet werden.

## Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt:  
<https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/HaeufigsteTodesursachen.html> (Stand Dezember 2014)
2. Pinaud M: [Evaluation of the cardiac risks in non-cardiac surgery in patients with heart failure]. *Archives des maladies du coeur et des vaisseaux* 2002, 95 Spec 4(5 Spec 4):21-26.
3. Polanczyk CA, Marcantonio E, Goldman L, Rohde LE, Orav J, Mangione CM, Lee TH: Impact of age on perioperative complications and length of stay in patients undergoing noncardiac surgery. *Annals of internal medicine* 2001, 134(8):637-643.
4. Sprung J, Abdelmalak B, Gottlieb A, Mayhew C, Hammel J, Levy PJ, O'Hara P, Hertzner NR: Analysis of risk factors for myocardial infarction and cardiac mortality after major vascular surgery. *Anesthesiology* 2000, 93(1):129-140.
5. Kertai MD, Klein J, Bax JJ, Poldermans D: Predicting perioperative cardiac risk. *Progress in cardiovascular diseases* 2005, 47(4):240-257.
6. Renz-Polster H, Krautzig S, Bätge B: Basislehrbuch Innere Medizin : kompakt - greifbar - verständlich. In., S. 79, 4., vollst. überarb. Aufl. edn. München [u.a.]: Elsevier; 2008.
7. Mardikar HM, Deshpande NV, Admane P: Recent advances in the management of acute myocardial infarction. *The Journal of the Association of Physicians of India* 2011, 59 Suppl:31-36.
8. Freude B, Masters TN, Robicsek F, Fokin A, Kostin S, Zimmermann R, Ullmann C, Lorenz-Meyer S, Schaper J: Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2000, 32(2):197-208.
9. Heyndrickx GR: Early reperfusion phenomena. *Seminars in cardiothoracic and vascular anesthesia* 2006, 10(3):236-241.
10. Zweier JL, Talukder MA: The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovascular research* 2006, 70(2):181-190.
11. Netter FH, Böttcher T: Netters Innere Medizin. Stuttgart [u.a.]: Thieme; 2010.
12. Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, Flack HA, Linn H: Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Archives of pathology* 1960, 70:68-78.
13. Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB: The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation* 1977, 56(5):786-794.
14. Kubler W, Spieckermann PG: Regulation of glycolysis in the ischemic and the anoxic myocardium. *Journal of molecular and cellular cardiology* 1970, 1(4):351-377.
15. Jennings RB, Reimer KA: The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annual review of medicine* 1991, 42:225-246.

16. James TN: Normal and abnormal consequences of apoptosis in the human heart. From postnatal morphogenesis to paroxysmal arrhythmias. *Circulation* 1994, 90(1):556-573.
17. Bolli R, Patel BS, Jeroudi MO, Lai EK, McCay PB: Demonstration of free radical generation in "stunned" myocardium of intact dogs with the use of the spin trap alpha-phenyl N-tert-butyl nitron. *The Journal of clinical investigation* 1988, 82(2):476-485.
18. Rossi F: The O<sub>2</sub><sup>-</sup>-forming NADPH oxidase of the phagocytes: nature, mechanisms of activation and function. *Biochimica et biophysica acta* 1986, 853(1):65-89.
19. Jugdutt BI, Hutchins GM, Bulkley BH, Becker LC: Salvage of ischemic myocardium by ibuprofen during infarction in the conscious dog. *The American journal of cardiology* 1980, 46(1):74-82.
20. Turrens JF, Boveris A: Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *The Biochemical journal* 1980, 191(2):421-427.
21. Kim JS, Jin Y, Lemasters JJ: Reactive oxygen species, but not Ca<sup>2+</sup>-overloading, trigger pH- and mitochondrial permeability transition-dependent death of adult rat myocytes after ischemia-reperfusion. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2006, 290(5):H2024-2034.
22. Borutaite V, Jekabsone A, Morkuniene R, Brown GC: Inhibition of mitochondrial permeability transition prevents mitochondrial dysfunction, cytochrome c release and apoptosis induced by heart ischemia. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2003, 35(4):357-366.
23. Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S: Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 1986, 320(6061):454-456.
24. Zweier JL, Broderick R, Kuppusamy P, Thompson-Gorman S, Lutty GA: Determination of the mechanism of free radical generation in human aortic endothelial cells exposed to anoxia and reoxygenation. *The Journal of biological chemistry* 1994, 269(39):24156-24162.
25. Vinten-Johansen J: Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovascular research* 2004, 61(3):481-497.
26. Jordan JE, Zhao ZQ, Vinten-Johansen J: The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovascular research* 1999, 43(4):860-878.
27. Elgebaly SA, Hashmi FH, Houser SL, Allam ME, Doyle K: Cardiac-derived neutrophil chemotactic factors: detection in coronary sinus effluents of patients undergoing myocardial revascularization. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 1992, 103(5):952-959.
28. Dreyer WJ, Michael LH, West MS, Smith CW, Rothlein R, Rossen RD, Anderson DC, Entman ML: Neutrophil accumulation in ischemic canine myocardium. Insights into time course, distribution, and mechanism of localization during early reperfusion. *Circulation* 1991, 84(1):400-411.
29. Deisher TA, Garcia I, Harlan JM: Cytokine-induced adhesion molecule expression on human umbilical vein endothelial cells is not regulated by

- cyclic adenosine monophosphate accumulation. *Life sciences* 1993, 53(4):365-370.
30. Gaboury JP, Anderson DC, Kubes P: Molecular mechanisms involved in superoxide-induced leukocyte-endothelial cell interactions in vivo. *The American journal of physiology* 1994, 266(2 Pt 2):H637-642.
  31. Toothill VJ, Van Mourik JA, Niewenhuis HK, Metzelaar MJ, Pearson JD: Characterization of the enhanced adhesion of neutrophil leukocytes to thrombin-stimulated endothelial cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1990, 145(1):283-291.
  32. Kubes P, Jutila M, Payne D: Therapeutic potential of inhibiting leukocyte rolling in ischemia/reperfusion. *The Journal of clinical investigation* 1995, 95(6):2510-2519.
  33. Kelly RA, Balligand JL, Smith TW: Nitric oxide and cardiac function. *Circulation research* 1996, 79(3):363-380.
  34. Wildhirt SM, Weismueller S, Schulze C, Conrad N, Kornberg A, Reichart B: Inducible nitric oxide synthase activation after ischemia/reperfusion contributes to myocardial dysfunction and extent of infarct size in rabbits: evidence for a late phase of nitric oxide-mediated reperfusion injury. *Cardiovascular research* 1999, 43(3):698-711.
  35. Rochitte CE, Lima JA, Bluemke DA, Reeder SB, McVeigh ER, Furuta T, Becker LC, Melin JA: Magnitude and time course of microvascular obstruction and tissue injury after acute myocardial infarction. *Circulation* 1998, 98(10):1006-1014.
  36. Zhao ZQ, Nakamura M, Wang NP, Velez DA, Hewan-Lowe KO, Guyton RA, Vinten-Johansen J: Dynamic progression of contractile and endothelial dysfunction and infarct extension in the late phase of reperfusion. *The Journal of surgical research* 2000, 94(2):133-144.
  37. Albertine KH, Weyrich AS, Ma XL, Lefer DJ, Becker LC, Lefer AM: Quantification of neutrophil migration following myocardial ischemia and reperfusion in cats and dogs. *Journal of leukocyte biology* 1994, 55(5):557-566.
  38. Manning AS, Hearse DJ: Reperfusion-induced arrhythmias: mechanisms and prevention. *Journal of molecular and cellular cardiology* 1984, 16(6):497-518.
  39. Verrier RL, Hagestad EL: Mechanisms involved in reperfusion arrhythmias. *European heart journal* 1986, 7 Suppl A:13-22.
  40. Bolli R, Marban E: Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiological reviews* 1999, 79(2):609-634.
  41. Ito H: No-reflow phenomenon and prognosis in patients with acute myocardial infarction. *Nature clinical practice Cardiovascular medicine* 2006, 3(9):499-506.
  42. Krug A, Du Mesnil de R, Korb G: Blood supply of the myocardium after temporary coronary occlusion. *Circulation research* 1966, 19(1):57-62.
  43. Hausenloy DJ, Yellon DM: Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *The Journal of clinical investigation* 2013, 123(1):92-100.

44. Manning AS, Coltart DJ, Hearse DJ: Ischemia and reperfusion-induced arrhythmias in the rat. Effects of xanthine oxidase inhibition with allopurinol. *Circulation research* 1984, 55(4):545-548.
45. Murphy E, Perlman M, London RE, Steenbergen C: Amiloride delays the ischemia-induced rise in cytosolic free calcium. *Circulation research* 1991, 68(5):1250-1258.
46. Bers DM: Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 2002, 415(6868):198-205.
47. Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB: The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *The Journal of clinical investigation* 1974, 54(6):1496-1508.
48. Engler RL, Dahlgren MD, Morris DD, Peterson MA, Schmid-Schonbein GW: Role of leukocytes in response to acute myocardial ischemia and reflow in dogs. *The American journal of physiology* 1986, 251(2 Pt 2):H314-323.
49. Kloner RA, Rude RE, Carlson N, Maroko PR, DeBoer LW, Braunwald E: Ultrastructural evidence of microvascular damage and myocardial cell injury after coronary artery occlusion: which comes first? *Circulation* 1980, 62(5):945-952.
50. Komamura K, Kitakaze M, Nishida K, Naka M, Tamai J, Uematsu M, Koretsune Y, Nanto S, Hori M, Inoue M *et al*: Progressive decreases in coronary vein flow during reperfusion in acute myocardial infarction: clinical documentation of the no reflow phenomenon after successful thrombolysis. *Journal of the American College of Cardiology* 1994, 24(2):370-377.
51. Manciet LH, Poole DC, McDonagh PF, Copeland JG, Mathieu-Costello O: Microvascular compression during myocardial ischemia: mechanistic basis for no-reflow phenomenon. *The American journal of physiology* 1994, 266(4 Pt 2):H1541-1550.
52. Ito H, Maruyama A, Iwakura K, Takiuchi S, Masuyama T, Hori M, Higashino Y, Fujii K, Minamino T: Clinical implications of the 'no reflow' phenomenon. A predictor of complications and left ventricular remodeling in reperfused anterior wall myocardial infarction. *Circulation* 1996, 93(2):223-228.
53. Gho BC, Schoemaker RG, van den Doel MA, Duncker DJ, Verdouw PD: Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. *Circulation* 1996, 94(9):2193-2200.
54. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA: Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986, 74(5):1124-1136.
55. Lawson CS, Downey JM: Preconditioning: state of the art myocardial protection. *Cardiovascular research* 1993, 27(4):542-550.
56. Marber MS, Latchman DS, Walker JM, Yellon DM: Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation* 1993, 88(3):1264-1272.
57. Baxter GF, Goma FM, Yellon DM: Characterisation of the infarct-limiting effect of delayed preconditioning: timecourse and dose-dependency

- studies in rabbit myocardium. *Basic research in cardiology* 1997, 92(3):159-167.
58. Yao Z, Mizumura T, Mei DA, Gross GJ: KATP channels and memory of ischemic preconditioning in dogs: synergism between adenosine and KATP channels. *The American journal of physiology* 1997, 272(1 Pt 2):H334-342.
59. Woolfson RG, Patel VC, Neild GH, Yellon DM: Inhibition of nitric oxide synthesis reduces infarct size by an adenosine-dependent mechanism. *Circulation* 1995, 91(5):1545-1551.
60. Headrick JP, Willis RJ: Effects of adenosine antagonism and beta-blockade during low-flow ischaemia in rat heart. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 1989, 16(11):885-891.
61. Cohen MV, Yang XM, Downey JM: Nitric oxide is a preconditioning mimetic and cardioprotectant and is the basis of many available infarct-sparing strategies. *Cardiovascular research* 2006, 70(2):231-239.
62. Krieg T, Cui L, Qin Q, Cohen MV, Downey JM: Mitochondrial ROS generation following acetylcholine-induced EGF receptor transactivation requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2004, 36(3):435-443.
63. Costa AD, Garlid KD, West IC, Lincoln TM, Downey JM, Cohen MV, Critz SD: Protein kinase G transmits the cardioprotective signal from cytosol to mitochondria. *Circulation research* 2005, 97(4):329-336.
64. Hausenloy DJ, Yellon DM: The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2003, 35(4):339-341.
65. Yellon DM, Downey JM: Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiological reviews* 2003, 83(4):1113-1151.
66. Hausenloy DJ, Yellon DM: New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovascular research* 2004, 61(3):448-460.
67. Spear JF, Prabu SK, Galati D, Raza H, Anandatheerthavarada HK, Avadhani NG: beta1-Adrenoreceptor activation contributes to ischemia-reperfusion damage as well as playing a role in ischemic preconditioning. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2007, 292(5):H2459-2466.
68. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, Vinten-Johansen J: Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2003, 285(2):H579-588.
69. Hausenloy DJ, Yellon DM: Survival kinases in ischemic preconditioning and postconditioning. *Cardiovascular research* 2006, 70(2):240-253.
70. Yellon DM, Baxter GF: Reperfusion injury revisited: is there a role for growth factor signaling in limiting lethal reperfusion injury? *Trends in cardiovascular medicine* 1999, 9(8):245-249.

71. Liu GS, Thornton J, Van Winkle DM, Stanley AW, Olsson RA, Downey JM: Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation* 1991, 84(1):350-356.
72. Schultz JE, Hsu AK, Gross GJ: Morphine mimics the cardioprotective effect of ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism in the rat heart. *Circulation research* 1996, 78(6):1100-1104.
73. Bolli R: The late phase of preconditioning. *Circulation research* 2000, 87(11):972-983.
74. Warltier DC, al-Wathiqui MH, Kampine JP, Schmeling WT: Recovery of contractile function of stunned myocardium in chronically instrumented dogs is enhanced by halothane or isoflurane. *Anesthesiology* 1988, 69(4):552-565.
75. Kersten JR, Schmeling TJ, Pagel PS, Gross GJ, Warltier DC: Isoflurane mimics ischemic preconditioning via activation of K(ATP) channels: reduction of myocardial infarct size with an acute memory phase. *Anesthesiology* 1997, 87(2):361-370.
76. Piriou V, Chiari P, Lhuillier F, Bastien O, Loufoua J, Raisky O, David JS, Ovize M, Lehot JJ: Pharmacological preconditioning: comparison of desflurane, sevoflurane, isoflurane and halothane in rabbit myocardium. *British journal of anaesthesia* 2002, 89(3):486-491.
77. Annecke T, Chappell D, Chen C, Jacob M, Welsch U, Sommerhoff CP, Rehm M, Conzen PF, Becker BF: Sevoflurane preserves the endothelial glycocalyx against ischaemia-reperfusion injury. *British journal of anaesthesia* 2010, 104(4):414-421.
78. Lange M, Redel A, Smul TM, Lotz C, Nefzger T, Stumpner J, Blomeyer C, Gao F, Roewer N, Kehl F: Desflurane-induced preconditioning has a threshold that is lowered by repetitive application and is mediated by beta 2-adrenergic receptors. *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia* 2009, 23(5):607-613.
79. Hanouz JL, Yvon A, Massetti M, Lepage O, Babatasi G, Khayat A, Bricard H, Gerard JL: Mechanisms of desflurane-induced preconditioning in isolated human right atria in vitro. *Anesthesiology* 2002, 97(1):33-41.
80. Kersten JR, Orth KG, Pagel PS, Mei DA, Gross GJ, Warltier DC: Role of adenosine in isoflurane-induced cardioprotection. *Anesthesiology* 1997, 86(5):1128-1139.
81. Ludwig LM, Patel HH, Gross GJ, Kersten JR, Pagel PS, Warltier DC: Morphine enhances pharmacological preconditioning by isoflurane: role of mitochondrial K(ATP) channels and opioid receptors. *Anesthesiology* 2003, 98(3):705-711.
82. Toller WG, Gross ER, Kersten JR, Pagel PS, Gross GJ, Warltier DC: Sarcolemmal and mitochondrial adenosine triphosphate- dependent potassium channels: mechanism of desflurane-induced cardioprotection. *Anesthesiology* 2000, 92(6):1731-1739.
83. Zaugg M, Lucchinetti E, Spahn DR, Pasch T, Schaub MC: Volatile anesthetics mimic cardiac preconditioning by priming the activation of mitochondrial K(ATP) channels via multiple signaling pathways. *Anesthesiology* 2002, 97(1):4-14.

84. Zaugg M, Lucchinetti E, Uecker M, Pasch T, Schaub MC: Anaesthetics and cardiac preconditioning. Part I. Signalling and cytoprotective mechanisms. *British journal of anaesthesia* 2003, 91(4):551-565.
85. Riess ML, Camara AK, Novalija E, Chen Q, Rhodes SS, Stowe DF: Anesthetic preconditioning attenuates mitochondrial Ca<sup>2+</sup> overload during ischemia in Guinea pig intact hearts: reversal by 5-hydroxydecanoic acid. *Anesthesia and analgesia* 2002, 95(6):1540-1546, table of contents.
86. Lange M, Smul TM, Blomeyer CA, Redel A, Klotz KN, Roewer N, Kehl F: Role of the beta1-adrenergic pathway in anesthetic and ischemic preconditioning against myocardial infarction in the rabbit heart in vivo. *Anesthesiology* 2006, 105(3):503-510.
87. Sasaki N, Sato T, Ohler A, O'Rourke B, Marban E: Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels by nitric oxide. *Circulation* 2000, 101(4):439-445.
88. Bolli R, Manchikalapudi S, Tang XL, Takano H, Qiu Y, Guo Y, Zhang Q, Jadoon AK: The protective effect of late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits is mediated by nitric oxide synthase. Evidence that nitric oxide acts both as a trigger and as a mediator of the late phase of ischemic preconditioning. *Circulation research* 1997, 81(6):1094-1107.
89. Smul TM, Lange M, Redel A, Burkhard N, Roewer N, Kehl F: Desflurane-induced preconditioning against myocardial infarction is mediated by nitric oxide. *Anesthesiology* 2006, 105(4):719-725.
90. Cromheecke S, Pepermans V, Hendrickx E, Lorsomradee S, Ten Broecke PW, Stockman BA, Rodrigus IE, De Hert SG: Cardioprotective properties of sevoflurane in patients undergoing aortic valve replacement with cardiopulmonary bypass. *Anesthesia and analgesia* 2006, 103(2):289-296, table of contents.
91. Etievent JP, Chocron S, Toubin G, Taberlet C, Alwan K, Clement F, Cordier A, Schipman N, Kantelip JP: Use of cardiac troponin I as a marker of perioperative myocardial ischemia. *The Annals of thoracic surgery* 1995, 59(5):1192-1194.
92. Garcia C, Julier K, Bestmann L, Zollinger A, von Segesser LK, Pasch T, Spahn DR, Zaugg M: Preconditioning with sevoflurane decreases PECAM-1 expression and improves one-year cardiovascular outcome in coronary artery bypass graft surgery. *British journal of anaesthesia* 2005, 94(2):159-165.
93. Fellahi JL, Gue X, Philippe E, Riou B, Gerard JL: Isoflurane may not influence postoperative cardiac troponin I release and clinical outcome in adult cardiac surgery. *European journal of anaesthesiology* 2004, 21(9):688-693.
94. De Hert SG: Cardioprotection with volatile anesthetics: clinical relevance. *Current opinion in anaesthesiology* 2004, 17(1):57-62.
95. Schlack W, Preckel B, Stunneck D, Thamer V: Effects of halothane, enflurane, isoflurane, sevoflurane and desflurane on myocardial reperfusion injury in the isolated rat heart. *British journal of anaesthesia* 1998, 81(6):913-919.

96. Preckel B, Schlack W, Comfere T, Obal D, Barthel H, Thamer V: Effects of enflurane, isoflurane, sevoflurane and desflurane on reperfusion injury after regional myocardial ischaemia in the rabbit heart in vivo. *British journal of anaesthesia* 1998, 81(6):905-912.
97. Schlack W, Preckel B, Barthel H, Obal D, Thamer V: Halothane reduces reperfusion injury after regional ischaemia in the rabbit heart in vivo. *British journal of anaesthesia* 1997, 79(1):88-96.
98. Smul TM, Lange M, Redel A, Stumpner J, Lotz CA, Roewer N, Kehl F: Desflurane-induced cardioprotection against ischemia-reperfusion injury depends on timing. *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia* 2009, 23(5):600-606.
99. Haelewyn B, Zhu L, Hanouz JL, Persehaye E, Roussel S, Ducouret P, Gerard JL: Cardioprotective effects of desflurane: effect of timing and duration of administration in rat myocardium. *British journal of anaesthesia* 2004, 92(4):552-557.
100. Chiari PC, Bienengraeber MW, Pagel PS, Krolikowski JG, Kersten JR, Warltier DC: Isoflurane protects against myocardial infarction during early reperfusion by activation of phosphatidylinositol-3-kinase signal transduction: evidence for anesthetic-induced postconditioning in rabbits. *Anesthesiology* 2005, 102(1):102-109.
101. Feng J, Lucchinetti E, Ahuja P, Pasch T, Perriard JC, Zaugg M: Isoflurane postconditioning prevents opening of the mitochondrial permeability transition pore through inhibition of glycogen synthase kinase 3beta. *Anesthesiology* 2005, 103(5):987-995.
102. Duchen MR, McGuinness O, Brown LA, Crompton M: On the involvement of a cyclosporin A sensitive mitochondrial pore in myocardial reperfusion injury. *Cardiovascular research* 1993, 27(10):1790-1794.
103. Griffiths EJ, Halestrap AP: Protection by Cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. *Journal of molecular and cellular cardiology* 1993, 25(12):1461-1469.
104. Lange M, Redel A, Lotz C, Smul TM, Blomeyer C, Frank A, Stumpner J, Roewer N, Kehl F: Desflurane-induced postconditioning is mediated by beta-adrenergic signaling: role of beta 1- and beta 2-adrenergic receptors, protein kinase A, and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Anesthesiology* 2009, 110(3):516-528.
105. Brodde OE, Bruck H, Leineweber K: Cardiac adrenoceptors: physiological and pathophysiological relevance. *Journal of pharmacological sciences* 2006, 100(5):323-337.
106. Brodde OE, Michel MC: Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacological reviews* 1999, 51(4):651-690.
107. Gerhardstein BL, Puri TS, Chien AJ, Hosey MM: Identification of the sites phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase on the beta 2 subunit of L-type voltage-dependent calcium channels. *Biochemistry* 1999, 38(32):10361-10370.
108. Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosemblyt N, Marks AR: PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* 2000, 101(4):365-376.

109. Simmerman HK, Jones LR: Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. *Physiological reviews* 1998, 78(4):921-947.
110. Maier LS, Bers DM: Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation-contraction coupling in the heart. *Cardiovascular research* 2007, 73(4):631-640.
111. Zhu WZ, Wang SQ, Chakir K, Yang D, Zhang T, Brown JH, Devic E, Kobilka BK, Cheng H, Xiao RP: Linkage of beta1-adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A-independent activation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase II. *The Journal of clinical investigation* 2003, 111(5):617-625.
112. Xiao RP, Zhu W, Zheng M, Cao C, Zhang Y, Lakatta EG, Han Q: Subtype-specific alpha1- and beta-adrenoceptor signaling in the heart. *Trends in pharmacological sciences* 2006, 27(6):330-337.
113. Xiao RP, Zhu W, Zheng M, Chakir K, Bond R, Lakatta EG, Cheng H: Subtype-specific beta-adrenoceptor signaling pathways in the heart and their potential clinical implications. *Trends in pharmacological sciences* 2004, 25(7):358-365.
114. Patel PA, Tilley DG, Rockman HA: Beta-arrestin-mediated signaling in the heart. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* 2008, 72(11):1725-1729.
115. Noma T, Lemaire A, Naga Prasad SV, Barki-Harrington L, Tilley DG, Chen J, Le Corvoisier P, Violin JD, Wei H, Lefkowitz RJ *et al*: Beta-arrestin-mediated beta1-adrenergic receptor transactivation of the EGFR confers cardioprotection. *The Journal of clinical investigation* 2007, 117(9):2445-2458.
116. Ellegast J: BASICS Klinische Pharmakologie. In., S. 25, 1. Aufl. edn. [s.l.]: Urban Fischer Verlag - Lehrbücher; 2011.
117. Yoshikawa T, Port JD, Asano K, Chidiak P, Bouvier M, Dutcher D, Roden RL, Minobe W, Tremmel KD, Bristow MR: Cardiac adrenergic receptor effects of carvedilol. *European heart journal* 1996, 17 Suppl B:8-16.
118. Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB, Starke K: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. In., 10. Aufl. edn. [s.l.]: Urban Fischer Verlag - Lehrbücher; 2011.
119. Lameris TW, de Zeeuw S, Alberts G, Boomsma F, Duncker DJ, Verdouw PD, Veld AJ, van Den Meiracker AH: Time course and mechanism of myocardial catecholamine release during transient ischemia in vivo. *Circulation* 2000, 101(22):2645-2650.
120. Prabu SK, Anandatheerthavarada HK, Raza H, Srinivasan S, Spear JF, Avadhani NG: Protein kinase A-mediated phosphorylation modulates cytochrome c oxidase function and augments hypoxia and myocardial ischemia-related injury. *The Journal of biological chemistry* 2006, 281(4):2061-2070.
121. Shizukuda Y, Buttrick PM: Subtype specific roles of beta-adrenergic receptors in apoptosis of adult rat ventricular myocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2002, 34(7):823-831.
122. Fleisher LA, Beckman JA, Brown KA, Calkins H, Chaikof EL, Fleischmann KE, Freeman WK, Froehlich JB, Kasper EK, Kersten JR *et*

- et al*: 2009 ACCF/AHA focused update on perioperative beta blockade incorporated into the ACC/AHA 2007 guidelines on perioperative cardiovascular evaluation and care for noncardiac surgery: a report of the American college of cardiology foundation/American heart association task force on practice guidelines. *Circulation* 2009, 120(21):e169-276.
123. Wallace A, Layug B, Tateo I, Li J, Hollenberg M, Browner W, Miller D, Mangano DT: Prophylactic atenolol reduces postoperative myocardial ischemia. McSPI Research Group. *Anesthesiology* 1998, 88(1):7-17.
124. Mangano DT, Layug EL, Wallace A, Tateo I: Effect of atenolol on mortality and cardiovascular morbidity after noncardiac surgery. Multicenter Study of Perioperative Ischemia Research Group. *The New England journal of medicine* 1996, 335(23):1713-1720.
125. Devereaux PJ, Yang H, Yusuf S, Guyatt G, Leslie K, Villar JC, Xavier D, Chrolavicius S, Greenspan L, Pogue J *et al*: Effects of extended-release metoprolol succinate in patients undergoing non-cardiac surgery (POISE trial): a randomised controlled trial. *Lancet* 2008, 371(9627):1839-1847.
126. Ibanez B, Macaya C, Sanchez-Brunete V, Pizarro G, Fernandez-Friera L, Mateos A, Fernandez-Ortiz A, Garcia-Ruiz JM, Garcia-Alvarez A, Iniguez A *et al*: Effect of Early Metoprolol on Infarct Size in ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction Patients Undergoing Primary Percutaneous Coronary Intervention: The Effect of Metoprolol in Cardioprotection During an Acute Myocardial Infarction (METOCARD-CNIC) Trial. *Circulation* 2013, 128(14):1495-1503.
127. Krum H: Beta-adrenoceptor blockers in chronic heart failure--a review. *British journal of clinical pharmacology* 1997, 44(2):111-118.
128. Mann DL, Kent RL, Parsons B, Cooper Gt: Adrenergic effects on the biology of the adult mammalian cardiocyte. *Circulation* 1992, 85(2):790-804.
129. Packer M, Carver JR, Rodeheffer RJ, Ivanhoe RJ, DiBianco R, Zeldis SM, Hendrix GH, Bommer WJ, Elkayam U, Kukin ML *et al*: Effect of oral milrinone on mortality in severe chronic heart failure. The PROMISE Study Research Group. *The New England journal of medicine* 1991, 325(21):1468-1475.
130. Hori M, Sasayama S, Kitabatake A, Toyooka T, Handa S, Yokoyama M, Matsuzaki M, Takeshita A, Origasa H, Matsui K *et al*: Low-dose carvedilol improves left ventricular function and reduces cardiovascular hospitalization in Japanese patients with chronic heart failure: the Multicenter Carvedilol Heart Failure Dose Assessment (MUCHA) trial. *American heart journal* 2004, 147(2):324-330.
131. Cleland JG, Charlesworth A, Lubsen J, Swedberg K, Remme WJ, Erhardt L, Di Lenarda A, Komajda M, Metra M, Torp-Pedersen C *et al*: A comparison of the effects of carvedilol and metoprolol on well-being, morbidity, and mortality (the "patient journey") in patients with heart failure: a report from the Carvedilol Or Metoprolol European Trial (COMET). *Journal of the American College of Cardiology* 2006, 47(8):1603-1611.

132. Bristow MR, Hershberger RE, Port JD, Gilbert EM, Sandoval A, Rasmussen R, Cates AE, Feldman AM: Beta-adrenergic pathways in nonfailing and failing human ventricular myocardium. *Circulation* 1990, 82(2 Suppl):I12-25.
133. Heilbrunn SM, Shah P, Bristow MR, Valantine HA, Ginsburg R, Fowler MB: Increased beta-receptor density and improved hemodynamic response to catecholamine stimulation during long-term metoprolol therapy in heart failure from dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1989, 79(3):483-490.
134. Gilbert EM, Abraham WT, Olsen S, Hattler B, White M, Mealy P, Larrabee P, Bristow MR: Comparative hemodynamic, left ventricular functional, and antiadrenergic effects of chronic treatment with metoprolol versus carvedilol in the failing heart. *Circulation* 1996, 94(11):2817-2825.
135. Hall JA, Kaumann AJ, Brown MJ: Selective beta 1-adrenoceptor blockade enhances positive inotropic responses to endogenous catecholamines mediated through beta 2-adrenoceptors in human atrial myocardium. *Circulation research* 1990, 66(6):1610-1623.
136. Motomura S, Deighton NM, Zerkowski HR, Doetsch N, Michel MC, Brodde OE: Chronic beta 1-adrenoceptor antagonist treatment sensitizes beta 2-adrenoceptors, but desensitizes M2-muscarinic receptors in the human right atrium. *British journal of pharmacology* 1990, 101(2):363-369.
137. Hall JA, Petch MC, Brown MJ: In vivo demonstration of cardiac beta 2-adrenoceptor sensitization by beta 1-antagonist treatment. *Circulation research* 1991, 69(4):959-964.
138. Tamaki S, Sakata Y, Mano T, Ohtani T, Takeda Y, Kamimura D, Omori Y, Yamamoto K: Long-term beta-blocker therapy improves diastolic function even without the therapeutic effect on systolic function in patients with reduced ejection fraction. *Journal of cardiology* 2010, 56(2):176-182.
139. Poulsen SH, Jensen SE, Egstrup K: Effects of long-term adrenergic beta-blockade on left ventricular diastolic filling in patients with acute myocardial infarction. *American heart journal* 1999, 138(4 Pt 1):710-720.
140. Keraliya RA, Patel C, Patel P, Keraliya V, Soni TG, Patel RC, Patel MM: Osmotic drug delivery system as a part of modified release dosage form. *ISRN pharmaceuticals* 2012, 2012:528079.
141. Clark JE, Marber MS: Advancements in pressure-volume catheter technology - stress remodelling after infarction. *Experimental physiology* 2012.
142. Pacher P, Nagayama T, Mukhopadhyay P, Batkai S, Kass DA: Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats. *Nature protocols* 2008, 3(9):1422-1434.
143. Baan J, van der Velde ET, de Bruin HG, Smeenk GJ, Koops J, van Dijk AD, Temmerman D, Senden J, Buis B: Continuous measurement of left ventricular volume in animals and humans by conductance catheter. *Circulation* 1984, 70(5):812-823.

144. Lympelopoulos A, Rengo G, Koch WJ: Adrenergic nervous system in heart failure: pathophysiology and therapy. *Circulation research* 2013, 113(6):739-753.
145. Lohse MJ, Engelhardt S, Eschenhagen T: What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? *Circulation research* 2003, 93(10):896-906.
146. Ozakca I, Arioglu-Inan E, Esfahani H, Altan VM, Balligand JL, Kayki-Mutlu G, Ozcelikay AT: Nebivolol prevents desensitization of beta-adrenoceptor signaling and induction of cardiac hypertrophy in response to isoprenaline beyond beta1-adrenoceptor blockage. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2013, 304(9):H1267-1276.
147. Bristow MR, Minobe WA, Reynolds MV, Port JD, Rasmussen R, Ray PE, Feldman AM: Reduced beta 1 receptor messenger RNA abundance in the failing human heart. *The Journal of clinical investigation* 1993, 92(6):2737-2745.
148. Booth JV, Ward EE, Colgan KC, Funk BL, El-Moalem H, Smith MP, Milano C, Smith PK, Newman MF, Schwinn DA: Metoprolol and coronary artery bypass grafting surgery: does intraoperative metoprolol attenuate acute beta-adrenergic receptor desensitization during cardiac surgery? *Anesthesia and analgesia* 2004, 98(5):1224-1231, table of contents.
149. Ferguson SS, Barak LS, Zhang J, Caron MG: G-protein-coupled receptor regulation: role of G-protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 1996, 74(10):1095-1110.
150. Shiina T, Arai K, Tanabe S, Yoshida N, Haga T, Nagao T, Kurose H: Clathrin box in G protein-coupled receptor kinase 2. *The Journal of biological chemistry* 2001, 276(35):33019-33026.
151. Ferguson SS: Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacological reviews* 2001, 53(1):1-24.
152. Lefkowitz RJ: G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *The Journal of biological chemistry* 1998, 273(30):18677-18680.
153. Bohm M, Schwinger RH, Erdmann E: [Alterations of the cAMP-adenylate cyclase system in the failing human heart. Consequences for the therapy with inotropic drugs]. *Klinische Wochenschrift* 1990, 68(18):887-895.
154. Kilts JD, Gerhardt MA, Richardson MD, Sreeram G, Mackensen GB, Grocott HP, White WD, Davis RD, Newman MF, Reves JG *et al*: Beta(2)-adrenergic and several other G protein-coupled receptors in human atrial membranes activate both G(s) and G(i). *Circulation research* 2000, 87(8):705-709.
155. Moore CA, Milano SK, Benovic JL: Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annual review of physiology* 2007, 69:451-482.
156. Ungerer M, Parruti G, Bohm M, Puzicha M, DeBlasi A, Erdmann E, Lohse MJ: Expression of beta-arrestins and beta-adrenergic receptor kinases in the failing human heart. *Circulation research* 1994, 74(2):206-213.

157. Dawson TM, Arriza JL, Jaworsky DE, Borisy FF, Attramadal H, Lefkowitz RJ, Ronnett GV: Beta-adrenergic receptor kinase-2 and beta-arrestin-2 as mediators of odorant-induced desensitization. *Science (New York, NY)* 1993, 259(5096):825-829.
158. Kranias EG, Solaro RJ: Phosphorylation of troponin I and phospholamban during catecholamine stimulation of rabbit heart. *Nature* 1982, 298(5870):182-184.
159. James P, Inui M, Tada M, Chiesi M, Carafoli E: Nature and site of phospholamban regulation of the Ca<sup>2+</sup> pump of sarcoplasmic reticulum. *Nature* 1989, 342(6245):90-92.
160. Steenbergen C, Fralix TA, Murphy E: Role of increased cytosolic free calcium concentration in myocardial ischemic injury. *Basic research in cardiology* 1993, 88(5):456-470.
161. Zhang T, Brown JH: Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovascular research* 2004, 63(3):476-486.
162. Wehrens XH, Lehnart SE, Reiken SR, Marks AR: Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circulation research* 2004, 94(6):e61-70.
163. Wang W, Zhu W, Wang S, Yang D, Crow MT, Xiao RP, Cheng H: Sustained beta1-adrenergic stimulation modulates cardiac contractility by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase signaling pathway. *Circulation research* 2004, 95(8):798-806.
164. Murray DP, Murray RG, Rafiqi E, Littler WA: Beta-adrenergic blockade in acute myocardial infarction: a haemodynamic and radionuclide study. *European heart journal* 1987, 8(8):845-854.
165. Nodari S, Metra M, Dei Cas L: Beta-blocker treatment of patients with diastolic heart failure and arterial hypertension. A prospective, randomized, comparison of the long-term effects of atenolol vs. nebivolol. *European journal of heart failure* 2003, 5(5):621-627.
166. Reimer KA, Rasmussen MM, Jennings RB: On the nature of protection by propranolol against myocardial necrosis after temporary coronary occlusion in dogs. *The American journal of cardiology* 1976, 37(4):520-527.
167. Reimer KA, Rasmussen MM, Jennings RB: Reduction by propranolol of myocardial necrosis following temporary coronary artery occlusion in dogs. *Circulation research* 1973, 33(3):353-363.
168. Randomised trial of intravenous atenolol among 16 027 cases of suspected acute myocardial infarction: ISIS-1. First International Study of Infarct Survival Collaborative Group. *Lancet* 1986, 2(8498):57-66.
169. Rasmussen MM, Reimer KA, Kloner RA, Jennings RB: Infarct size reduction by propranolol before and after coronary ligation in dogs. *Circulation* 1977, 56(5):794-798.
170. Burmeister WE, Reynolds RD, Lee RJ: Limitation of myocardial infarct size by atenolol, nadolol and propranolol in dogs. *European journal of pharmacology* 1981, 75(1):7-10.

171. Reduction of infarct size by the early use of intravenous timolol in acute myocardial infarction. International Collaborative Study Group. *The American journal of cardiology* 1984, 54(11):14E-15E.
172. Dunzendorfer S, Wiedermann CJ: Modulation of neutrophil migration and superoxide anion release by metoprolol. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2000, 32(6):915-924.
173. Tong H, Bernstein D, Murphy E, Steenbergen C: The role of beta-adrenergic receptor signaling in cardioprotection. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2005, 19(8):983-985.
174. Frances C, Nazeyrollas P, Prevost A, Moreau F, Pisani J, Davani S, Kantelip JP, Millart H: Role of beta 1- and beta 2-adrenoceptor subtypes in preconditioning against myocardial dysfunction after ischemia and reperfusion. *Journal of cardiovascular pharmacology* 2003, 41(3):396-405.
175. Solenkova NV, Solodushko V, Cohen MV, Downey JM: Endogenous adenosine protects preconditioned heart during early minutes of reperfusion by activating Akt. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2006, 290(1):H441-449.
176. Kim IM, Tilley DG, Chen J, Salazar NC, Whalen EJ, Violin JD, Rockman HA: Beta-blockers alprenolol and carvedilol stimulate beta-arrestin-mediated EGFR transactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008, 105(38):14555-14560.
177. Lange M, Smul TM, Redel A, Lotz C, Jazbutyte V, Schnupp V, Roewer N, Kehl F: Differential role of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in desflurane-induced preconditioning and cardioprotection by metoprolol: metoprolol blocks desflurane-induced preconditioning. *Anesthesiology* 2008, 109(1):72-80.
178. Malfatto G, Facchini M, Branzi G, Riva B, Sala L, Perego GB: Long-term treatment with the beta-blocker carvedilol restores autonomic tone and responsiveness in patients with moderate heart failure. *Journal of cardiovascular pharmacology* 2003, 42(1):125-131.
179. Hall SA, Cigarroa CG, Marcoux L, Risser RC, Grayburn PA, Eichhorn EJ: Time course of improvement in left ventricular function, mass and geometry in patients with congestive heart failure treated with beta-adrenergic blockade. *Journal of the American College of Cardiology* 1995, 25(5):1154-1161.
180. Smul TM, Stumpner J, Blomeyer C, Lotz C, Redel A, Lange M, Roewer N, Kehl F: Propofol inhibits desflurane-induced preconditioning in rabbits. *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia* 2011, 25(2):276-281.
181. Booth JV, Landolfo KP, Chesnut LC, Bennett-Guerrero E, Gerhardt MA, Atwell DM, El-Moalem HE, Smith MS, Funk BL, Kuhn CM *et al*: Acute depression of myocardial beta-adrenergic receptor signaling during cardiopulmonary bypass: impairment of the adenylyl cyclase moiety. Duke Heart Center Perioperative Desensitization Group. *Anesthesiology* 1998, 89(3):602-611.
182. Yazicioglu L, Eryilmaz S, Sirlak M, Inan MB, Aral A, Tasoz R, Akalin H: The effect of preoperative digitalis and atenolol combination on

- postoperative atrial fibrillation incidence. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* 2002, 22(3):397-401.
183. Haghjoo M, Saravi M, Hashemi MJ, Hosseini S, Givtaj N, Ghafarinejad MH, Khamoushi AJ, Emkanjoo Z, Fazelifar AF, Alizadeh A *et al*: Optimal beta-blocker for prevention of atrial fibrillation after on-pump coronary artery bypass graft surgery: carvedilol versus metoprolol. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society* 2007, 4(9):1170-1174.
184. Small KM, McGraw DW, Liggett SB: Pharmacology and physiology of human adrenergic receptor polymorphisms. *Annual review of pharmacology and toxicology* 2003, 43:381-411.
185. Igarashi N, Nozawa T, Fujii N, Suzuki T, Matsuki A, Nakadate T, Igawa A, Inoue H: Influence of beta-adrenoceptor blockade on the myocardial accumulation of fatty acid tracer and its intracellular metabolism in the heart after ischemia-reperfusion injury. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* 2006, 70(11):1509-1514.
186. Trotz M, Jellison EJ, Hostetler KY: Propranolol inhibition of the neutral phospholipases A of rat heart mitochondria, sarcoplasmic reticulum and cytosol. *Biochemical pharmacology* 1987, 36(24):4251-4256.

## Danksagung

---

Bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Markus Lange für die Überlassung des interessanten Themas und Möglichkeit diese wissenschaftliche Arbeit anzufertigen.

Ebenso möchte ich mich bei meinem Betreuer Herrn Tobias Tischer-Zeitz für die Unterstützung, zahlreichen Anregungen und die konstruktive Kritik bei der Erstellung meiner Dissertation bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Norbert Roewer für die Ermöglichung diese Dissertation in seiner Klinik anzufertigen.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe unter der Leitung von Herrn Dr. med. Jan Stumpner für die Einarbeitung in die Molekularbiologie und die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Vor allem danke ich meinen Eltern für die Ermöglichung des Studiums und die beständige Unterstützung und Motivation.

**Lebenslauf**

■ **Persönliche Daten**

Name: Christina Juliane Hille  
Geburtsdatum und –ort: 03.07.1987 in Steinfurt  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

■ **Universitärer Werdegang**

08/2013 Approbation als Zahnärztin  
06/2013 Staatsexamen Zahnmedizin  
10/2010 Physikum Zahnmedizin  
03/2009 Naturwissenschaftliche Vorprüfung  
04/2008-06/2013 Studium der Zahnheilkunde, Julius-  
Maximilians-Universität Würzburg

■ **Schulischer Werdegang**

06/2007 Abitur  
1998-2007 Gymnasium Borghorst  
1994-1998 Mariengrundschule Steinfurt