

Aus der Klinik für Kardiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Eine pharmakologische Stimulierung der endothelialen NO-Synthese führt zu einer Verbesserung der diastolischen Dysfunktion im hypertensiven Dahl-Salz Rattenmodell

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Utz Richter

aus Dresden

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. C. Tschöpe
2. Prof. Dr. med. U. Laufs
3. Priv.-Doz. Dr. med. Vetter

Datum der Promotion: 16.05.2010

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1. Herzinsuffizienz mit normal/gesteigerter EF

1.1.1. Definition.....	S. 07
1.1.2. Prävalenz.....	S. 08
1.1.3. Mortalität.....	S. 10
1.1.4. Ätiologie.....	S. 11
1.1.5. Diagnose.....	S. 12

1.2. Hämodynamik

1.2.1. Echokardiographie.....	S. 15
1.2.2. Linksherzkatheter.....	S. 16

1.3. Herzzyklus.....S. 17

1.4. Pathologie der diastolischen Dysfunktion.....S. 19

1.4.1. Kardiomyozyt.....	S. 20
1.4.2. extrazelluläre Matrix.....	S. 21
1.4.3. neurohumorale Aktivierung.....	S. 22
1.4.3.1. <i>natriuretische Peptide</i>	S. 22
1.4.3.2. <i>NO-System</i>	S. 23

1.5. Pharmakotherapie.....S. 26

1.6. Aufgabenstellung.....S. 27

2. Material und Methodik

2.1. Studiendesign	S. 30
2.2. Rattenstämme	S. 31
2.3. pharmakologische Behandlung	S. 31
2.4. Tierhaltung	S. 33
2.5. Hämodynamik	S. 33
2.5.1. Echokardiographie.....	S. 33
2.5.2. Linksherzkatheter.....	S. 34
2.6. Ablauf der invasiven- und nicht-invasiven Diagnostik	S. 35
2.6.1. Anästhesie.....	S. 35
2.6.2. Ablauf Echokardiographie.....	S. 35
2.6.2.1. <i>M-mode</i>	S. 36
2.6.2.2. <i>2D-mode</i>	S. 36
2.6.3. Intubation und Ventilation.....	S. 37
2.6.4. Ablauf Linksherzkatheter.....	S. 38
2.6.4.1. Kalibrierung des Konduktanzkatheters.....	S. 38
2.6.5. Hämodynamische Messung durch Konduktanzkatheter.....	S. 39
2.6.5.1. <i>Vorlast-abhängige Parameter</i>	S. 39
2.6.5.2. <i>Vorlast-unabhängige Parameter</i>	S. 39
2.6.5.3. <i>Systolische Parameter</i>	S. 39
2.6.5.4. <i>Diastolische Parameter</i>	S. 40
2.7. Organentnahme	S. 41
2.8. Picro-Sirius-Rot Färbung	S. 42
2.9. Statistische Auswertung	S. 42

3. Ergebnis

3.1. Echokardiographie	S. 44
3.1.1. Linksventrikuläre Auswurfraction – EF.....	S. 44
3.1.2. Enddiastolisches Volumen – EDV.....	S. 45
3.1.3. Linksventrikuläre Hypertrophieindex – LVH Index.....	S. 46
3.1.4. Herzgewicht.....	S. 47
3.2. Konduktanzkatheter	S. 48
3.2.1. Systolische Parameter.....	S. 48
3.2.1.1. <i>Herzfrequenz – HF</i>	S. 48
3.2.1.2. <i>linksventrikulärer endsystolischer Druck – LVESP</i>	S. 48
3.2.1.3. <i>Kontraktilität – dP/dt max</i>	S. 49
3.2.1.4. <i>Schlagvolumen – SV</i>	S. 50
3.2.1.5. <i>Herzminutenvolumen – HMV</i>	S. 50
3.2.1.6. <i>Endsystolisches Volumen – ESV</i>	S. 51
3.2.2. diastolische Parameter.....	S. 52
3.2.2.1. <i>minimale Druckabfallgeschwindigkeit – dP/dt min</i>	S. 52
3.2.2.2. <i>linksventrikulärer enddiastolischer Druck –LVEDP</i>	S. 52
3.2.2.3. <i>Tau</i>	S. 53
3.2.2.4. <i>enddiastolische Druck-Volumen Beziehung – EDPVR</i>	S. 54
3.3. Kardiale Fibrose	S. 55
3.4. Zusammenfassung Hämodynamik	S. 56

4. Diskussion

4.1. Material und Methodik	S. 57
4.1.1. Tiermodell.....	S. 57
4.1.2. Hämodynamik.....	S. 58
4.1.3. Anästhesie.....	S. 60
4.2. Ergebnisse	S. 61
4.2.1. systolische Parameter.....	S. 61
4.2.2. diastolische Parameter.....	S. 64
4.2.3. Wirkung von NO.....	S. 70
4.3. Einschränkung dieser Studie	S. 74
4.4. Zusammenfassung	S. 75

5. Anhang

5.1. Literaturverzeichnis	S. 76
5.2. Abkürzungen	S. 86
5.3. Abbildungsverzeichnis	S. 87
5.4. Tabellenverzeichnis	S. 88
Selbstständigkeitserklärung.....	S. 89
Lebenslauf.....	S. 90
Publikation/Auszeichnung.....	S. 91
Danksagung.....	S. 92

1. Einleitung

Die Herzinsuffizienz ist ein klinisches Syndrom charakterisiert durch klinische Symptome, die auf Grundlage einer linksventrikulären Dysfunktion entstehen und zu einem verminderten Angebot an Blutvolumen und Sauerstoff in den Organen führt. Häufig werden die pathophysiologisch entstandenen Beschwerden von den Betroffenen als Luftnot bei Belastung beschrieben, die in fortgeschrittenen Stadien auch bei leichter körperlicher Anstrengung oder in Ruhe auftreten können. Die Möglichkeiten der Echokardiographie oder Herzkatheteruntersuchung stellen dabei eine etablierte Diagnostik im klinischen Alltag dar. Sie zeigen bei 50% der Patienten mit klinischen Symptomen einer Herzinsuffizienz eine isolierte diastolische Funktionsstörung mit einer normalen systolischen Pumpfunktion, die auch als isolierte diastolische Herzinsuffizienz beschrieben wird [1],[2]. Die Prävalenz der diastolischen Herzinsuffizienz nimmt dabei jährlich um 1% zu [3]. Einer der wichtigsten prädisponierenden Faktoren, aus denen sich sekundär eine diastolische Funktionsstörung entwickeln kann, ist der arterielle Hypertonus. Nach den neuen Leitlinien der *European Society of Cardiology* wird die isolierte diastolische Herzinsuffizienz auch als Herzinsuffizienz mit normaler Ejektionsfraktion - HFNEF und im Gegensatz dazu die systolische Herzinsuffizienz als Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion - HFREF beschrieben [4].

1.1 Herzinsuffizienz mit normaler EF (HFNEF)

1.1.1. Definition

Die Herzinsuffizienz ist ein klinisches Syndrom und setzt sich aus Symptomen zusammen, die durch gesteigerte, extravaskuläre Wasseransammlung und verminderter Organ- und Gewebeperfusion entstehen [5]. Als einer der ersten wurden Gandhi und seine Mitarbeiter darauf aufmerksam, dass Patienten mit einem akuten Lungenödem keine wesentliche Verschlechterung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF), als Ausdruck einer unauffälligen systolischen Funktion, über den Verlauf von drei Tagen zeigten. Diese

klinischen Merkmale wurden als Herzinsuffizienz mit normaler LVEF über 50% und gestörter diastolischer Funktion beschrieben und können nach den neuen Leitlinien als HFNEF bezeichnet werden [6].

1.1.2. Prävalenz

Die Herzinsuffizienz ist eine der häufigsten internistischen Erkrankungen und zeigt eine Prävalenz von 51 % in einer Normalpopulation [7]. Bis zu 50 % dieses herzinsuffizienten Patientenkollektivs zeigen bei hämodynamischen Messungen eine normale systolische Funktion mit einer isolierten diastolischen Funktionsstörung [8-10]. Eine Studie beobachtete über den Zeitraum von 15 Jahren Patienten mit klinischen Symptomen einer Herzinsuffizienz. Dabei wurden die Patienten anhand einer normalen systolischen Pumpfunktion beurteilt. In diesem Studienzeitraum zeigte sich ein kontinuierlicher Anstieg bei den Patienten mit hämodynamisch nachweisbarer normaler LVEF über 50% und gleichzeitig bestehenden klinischen Symptomen.

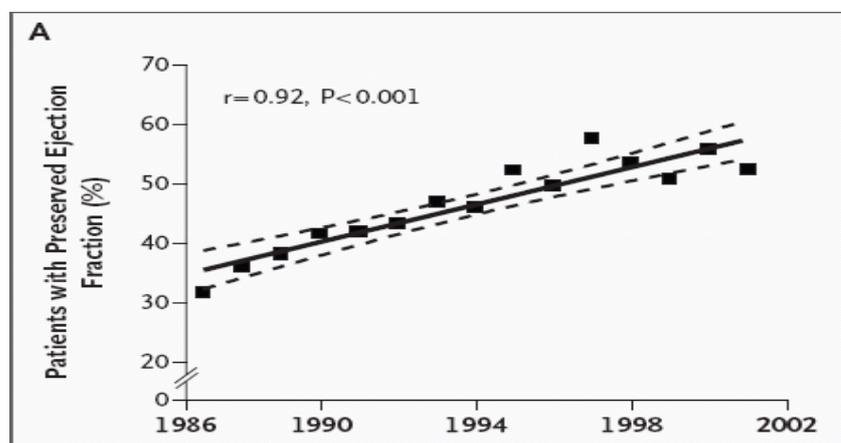


Abb.1: Prävalenz HFNEF im Verlauf von 15 Jahren, Owen et al., NEJM, 2006 [3]

Dieser kontinuierliche Anstieg dieser Gruppe erreichte nach 15 Jahren die ungefähr gleiche Prävalenz im Vergleich zu Patienten mit einer systolischen Pumpfunktionsstörung

und eingeschränkter LVEF unter 50 % bei dem insgesamt gescreenten Patientenkollektiv mit Herzinsuffizienz. .

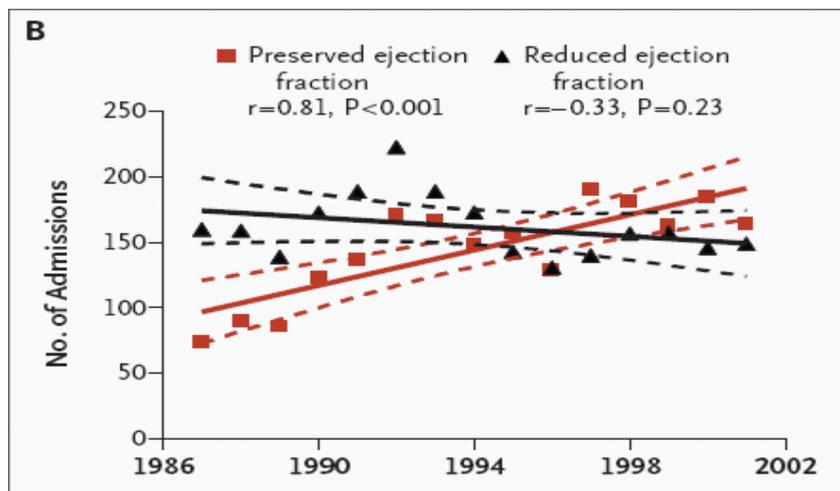


Abb.2: Prävalenz HFNEF versus HFREF, Owan et al., NEJM, 2006 [3]

Besonders Patienten mit einem Alter von über 70 Jahren entwickeln eine diastolische Funktionsstörung. Bei diesen Patienten konnte in Studien eine 50%ige Prävalenz für das Auftreten einer HFNEF gezeigt werden [7,11,12]. Diese Ergebnisse wurde ebenfalls in einer Studie des Italian Network on Congestive Heart Failure bestätigt [13]. Es zeigte sich dabei kein signifikanter Unterschied in der Morbidität im Gegensatz zu Patienten mit systolischer Herzinsuffizienz und einem Alter von über 70 Jahren [14,15]. Neben der mit zunehmendem Lebensalter ansteigenden Morbidität, ist die Anzahl der Diagnosen HFNEF besonders beim weiblichen Geschlecht erhöht. Ausserdem zeigt sich eine signifikante Häufigkeit für diastolische Funktionsstörungen bei Patienten mit Bluthochdruck oder Vorhofflimmern [16]. Die Morbidität zeigt zusammenfassend eine Korrelation zwischen Geschlecht, Alter und Vorerkrankung.

1.1.3. Mortalität

In der Framingham-Studie wurde in einem Untersuchungszeitraum von fünf Jahren eine vierfach höhere Mortalitätsrate bei herzinsuffizienten Patienten gegenüber einer gesunden Population dokumentiert [7]. Die jährliche Mortalitätsrate der HFNEF liegt bei 8 % und ist damit zwar geringer als bei Patienten mit HFREF, die eine jährliche Mortalität von 19 % zeigen – es besteht aber immer noch eine doppelte Letalität gegenüber einem nicht herzinsuffizienten Vergleichskollektiv [2]. Eine Studie untersuchte die Mortalität von Patienten mit HFREF und HFNEF innerhalb eines Studienzeitraumes von fünf Jahren. In dieser Studie wurden die Patienten ebenfalls anhand ihrer linksventrikulären Auswurfraction charakterisiert. Dabei konnte im Studienverlauf kein signifikanter Unterschied in der Mortalität von Patienten mit HFNEF oder HFREF festgestellt werden [3]. Weiterhin konnte in weiteren Studien bestätigt werden, dass Patienten mit HFNEF oder HFREF und einem Alter über 70 Jahren keinen Unterschied in der Letalitätsrate aufweisen [17]. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Letalität der HFNEF mit Höhe des Lebensalters korreliert [12].

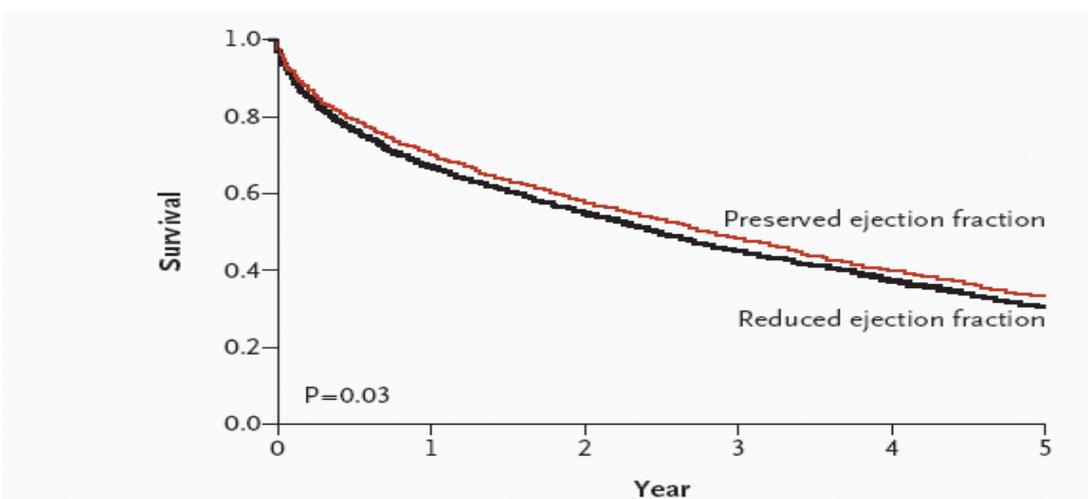


Abb.3: Kaplan-Meier-Überlebenskurve, Owan et al., 2006 [3]

Die Mortalität steht dabei ebenfalls im Zusammenhang mit Alter, Geschlecht und Vorerkrankung [18,19].

1.1.4. Ätiologie

Bei Patienten mit klinischen Zeichen einer Herzinsuffizienz wird in 75 % der Fälle ein arterieller Hypertonus diagnostiziert. Der arterielle Hypertonus stellt eine der Hauptursachen dar, die zur Entwicklung einer diastolischen Funktionsstörung führen [20]. Auch in den großen Herzinsuffizienz-Studien *SOLVD* und *SAVE* wurde ein vermehrtes Auftreten der HFNEF bei Hypertonikern beobachtet. Vor allem Patienten mit metabolischem Syndrom sind als Risikogruppe einzustufen [21]. Denn eine hohe Insulinresistenz ist ebenfalls häufig mit einem arteriellen Hypertonus assoziiert [22]. In der *Strong Heart* -Studie konnte gezeigt werden, dass 80% der Patienten mit einem Diabetes mellitus eine diastolische Dysfunktion entwickeln [23]. Die diastolische Dysfunktion kann aber auch ein frühes Zeichen einer diabetischen Kardiomyopathie darstellen [24]. Neben dem arteriellen Hypertonus konnten [25]

- KHK (koronare Herzerkrankung) [16]
- akute Myokardischämie [26]
- Diabetes mellitus [23]
- Schlafapnoe-Syndrom [27]
- Klappenerkrankungen (z.B. Aortenstenose) [28]
- Kardiomyopathien (obstruktive/nicht-obstruktive, restriktive, infiltrative Kardiomyopathie, z.B. Amyloidose) [29]
- Erkrankungen der endokrinen Organe (z.B. Schilddrüsenfunktionsstörung, Akromegalie) [30]
- Veränderungen des Perikards (Fibrose) [28]

als primäre Krankheitsursachen erkannt werden, aus denen sich sekundär eine mögliche HFNEF entwickeln kann [28,31] .

1.1.5. Diagnose

Um die Diagnose HFNEF stellen zu können, veröffentlichte die *European Study Group on Diastolic Heart Failure* klinisch grundlagenbasierende Diagnosekriterien, die 2007 von der *European Society of Cardiology* erneut überarbeitet wurden [4]. Dabei wird die systolische Herzinsuffizienz als Herzinsuffizienz mit einer reduzierten linksventrikulären Ejektionsfraktion unter 50 % als HFREF und die diastolische Herzinsuffizienz als Herzinsuffizienz mit einer normalen oder nur geringgradig eingeschränkten linksventrikulärer Ejektionsfraktion über 50% als HFNEF definiert. Nach den neuen Leitlinien müssen folgende drei Punkte bei den betroffenen Patienten eruierbar sein um die Diagnose einer HFNEF stellen zu können.

1. Primär sollten klinische Symptome und/oder Zeichen einer Herzinsuffizienz vorhanden sein, die von den Betroffenen als Belastungs- oder Ruhedyspnoe geschildert und nach dem Klassifikationsschema der New-York-Heart-Association (NYHA I-IV) eingeteilt werden. Bei der körperlichen Untersuchung können Zeichen der Rechts- und Linksherzinsuffizienz vorhanden sein [27,31]. Es ist aber nicht möglich, anhand der klinischen Symptome zwischen einer systolischen oder diastolischen Herzinsuffizienz zu unterscheiden [4].
2. Das Vorhandensein einer normalen oder nur gering veränderten linksventrikulären systolischen Ejektionsfraktion über 50% und normwertigen linksventrikulären Diameter stellt das zweite Kriterium dar [4,32,33].
3. Für das Vorliegen einer diastolischen Dysfunktion sollte durch nicht-invasive hämodynamische Messungen oder invasiver Diagnostik eine isovolumetrische Relaxationsverzögerung, Füllungsstörung, verminderte linksventrikuläre Dehnbarkeit und erhöhte linksventrikuläre Steifheit gemessen werden. Diese können einzeln oder zusammen Auftreten und erlauben die beschreibende Diagnose einer HFNEF [10,34].

Bei 92 % der Patienten mit bekannter diastolischer Herzinsuffizienz und Nachweis einer konzentrischen linksventrikulären Hypertrophie ist in Messungen ein erhöhter linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP) feststellbar. Ausserdem zeigen sich Zeichen einer gestörten diastolischen Relaxation, Blutfüllung und eine zunehmende Steifheit des linken Ventrikels [10]. Der Nachweis einer konzentrischen Hypertrophie besitzt für sich alleine bereits eine wichtige Bedeutung für eine direkte Aussage über die diastolische Dysfunktion. Um die Diagnose einer HFNEF weiter zu verifizieren gibt die *Society of Cardiology* verschiedene Wege vor. Dabei werden Echokardiographie, Herzkatheter und die Serumbestimmung von NT-pro BNP und BNP genutzt [4]. In den nächsten Punkten werden die verschiedenen diagnostischen Wege dargestellt.

1. Bei Patienten mit den klinischen Zeichen einer HFNEF und LVEF über 50% sollte durch Messungen mit dem Gewebsdoppler ein mittleres E/E´-Verhältnis über 15 feststellbar sein. Dies führt zu einer direkten Bestätigung der HFNEF. Das E/E´-Verhältnis korreliert dabei mit dem linksventrikulären Füllungsdruck. Liegt das E/E´-Verhältnis zwischen 8 und 15 so ist die HFNEF nicht eindeutig und es sollten Serumbestimmung von BNP und NT-pro BNP erfolgen. Liegt NT-pro BNP über 220 pg/ml und BNP über 200 pg/ml, so ist die Diagnose HFNEF zu stellen. Wird keine Serumbestimmung durchgeführt, sollte mittels echokardiographischer Blutflussdoppler-Messungen ein E/A < 0,5 und eine Dezelerationszeit über 280 ms bestimmt werden. Diese Parameter aus dem Blutflussdoppler beschreiben ebenfalls die Relaxation des Myokards. Dies, zusammen mit dem Gewebedoppler E/E´-Verhältnis zwischen 8 und 15, erlaubt ebenfalls ohne Serumbestimmung von BNP und NT-proBNP die Diagnose HFNEF [4].
2. Bei Patienten mit den klinischen Zeichen einer HFNEF und LVEF über 50%, bei denen zuerst eine Serumbestimmung von NT-pro BNP (> 220 pg/ml) und BNP (>200 pg/ml) durchgeführt wird, muss durch darauffolgende Messung im Gewebedoppler ein E/E´-Verhältnis über 8 vorliegen. Dann kann die Diagnose HFNEF gestellt werden [4].

3. Bei Patienten mit den klinischen Zeichen einer HFNEF und LVEF über 50 %, bei denen als erste Diagnostik eine Herzkatheteruntersuchung durchgeführt wird, müssen ein mPCW > 12 mmHg oder ein Tau > 48 ms oder ein erhöhter LVEDP > 16 mmHg gemessen werden. Dies erlaubt ebenfalls nach der *Society of Cardiology* die Diagnose HFNEF [4].

Die Serumbestimmung von BNP ist aber kein Screening-Verfahren für die präklinische Diagnostik einer diastolischen Herzinsuffizienz. Denn die Serumkonzentration von BNP steigt mit zunehmendem Alter und ist beim weiblichen Geschlecht erhöht [35]. Andere Erkrankungen wie Sepsis, Leber- und Niereninsuffizienz beeinflussen die BNP-Werte [36,37]. Eine positive BNP-Bestimmung ist also kein alleiniges Diagnosekriterium und sollte mittels Echokardiographie ergänzt werden [38]. Die natriuretischen Proteine werden aber zum Ausschluss einer pulmonalen Ursache der Dyspnoe empfohlen [4].

1.2. Hämodynamik

Die Erfassung und Analyse der Herzfunktion ist für die Diagnosestellung entscheidend. Neben der Echokardiographie gilt die invasive Messung des Drucks im linken Ventrikel als wesentlich und wird heute in der Klinik routinemäßig durchgeführt. Druck und Volumen haben Einfluss auf die Herzfunktion. Schon Otto Frank und Ernest Starling, die den Herzzyklus als graphische Druck-Volumen-Kurve aufzeichneten, erkannten diesen Zusammenhang. Aufgrund dieser Druck-Volumen-Kurve war es möglich, physiologische Aspekte der Herzfunktion im Frank-Starling-Mechanismus zu erklären. Seit den 80er Jahren kann diese Druck-Volumen-Kurve des linken Ventrikels beim Menschen aufgezeichnet werden. Aufgrund der genauen Beurteilungen der Herzfunktion ist die hämodynamische Messung durch das Konduktanzverfahren eine standardisierte Methode im Klinikalltag. Ein Problem stellt jedoch der hohe technische Aufwand dar, weswegen der Konduktanzkatheter selten zur Primärdiagnostik eingesetzt wird. Im Kleintiermodell steht diese Methode erst seit kurzem zur Verfügung und gilt trotz des technischen Aufwands als eines der wichtigsten tierphysiologischen Untersuchungen.

1.2.1. Echokardiographie

Für die Untersuchung einer HFNEF hat sich die nicht-invasive hämodynamische Diagnostik in Form von Echokardiographie als beste Diagnostik durchgesetzt [39-42]. Mit dieser unkomplizierten Messung kann bei Patienten mit klinischen Zeichen einer Herzinsuffizienz eine LVEF über 50% berechnet werden. Ebenfalls wird die Hypertrophie des Herzens bestimmt [43,44]. Während bei einer HFREF eine exzentrische Hypertrophie mit Abnahme der relativen Wanddicke und Zunahme des linksventrikulären-enddiastolischen Durchmessers beobachtet wird, zeigt sich bei einer HFNEF eine konzentrische Hypertrophie mit Zunahme der relativen Wanddicke und Abnahme des linksventrikulären-enddiastolischen Durchmessers [45,46]. Unsere Arbeitsgruppe konnte den Vorteil des Gewebedopplers, der im Gegensatz zum Pulsdoppler die Geschwindigkeit des Gewebes misst, zeigen [47]. Durch die Bestimmung des E/E'-Verhältnisses aus der Flussgeschwindigkeit des Blutes durch die Gewebeschwindigkeit an der Mitralklappe wird die diastolische Funktion beurteilt. Dabei korreliert das E/E'-Verhältnis mit der invasiv messbaren Relaxation [48]. Im Gewebedoppler kann die Dezelerationszeit – das ist die Zeit vom Maximum der E-Welle bis zu ihrem Ende – bestimmt werden. Sie gibt die Dauer an, die der linke Ventrikel bis zur vollständigen Entspannung braucht und ist somit bei erhöhter Steifigkeit und verminderter Dehnbarkeit erhöht. Dagegen wird im Mitralfussdoppler die Geschwindigkeit des Blutes an der Mitralklappe gemessen und das E/A-Verhältnis beurteilt. Die E-Welle entsteht durch den passiven Einstrom des Blutes in den linken Ventrikel in Folge der Entspannung des ventrikulären Myokards. Die A-Welle ist Ausdruck der Vorhofkontraktion. Physiologisch sollte der passive Einstrom größer als die aktive Pumpleistung des Vorhofs sein. Es ist aber zu beachten, dass dieser Parameter altersabhängigen Veränderungen unterliegt [49]. Die alleinige Diagnostik einer HFNEF durch Blutflussdoppler-Messungen zeigt keine zuverlässigen Ergebnisse und besitzt 40-60 % geringere Aussagekraft als eine Herzkatheteruntersuchung [10,50,51]. Es gibt also keinen singulären Parameter, der eine diastolische Funktionsstörung absolut erfasst. Anhand der gewonnenen Untersuchungsdaten ist aber eine Bestätigung der Diagnose HFNEF mit einer Sensitivität von über 98% möglich [52,53].

1.2.2. Herzkatheter

Durch die Konduktanzmessung mit Linksherzkatheter ist es möglich, eine Aussage über den linksventrikulären Druck, über die Relaxation und das linksventrikuläre Volumen zu treffen. Ein großer Vorteil dieser Untersuchung ist die Möglichkeit der kurzfristigen Vorlastsenkung. Durch diese Methodik können Parameter gemessen werden, die von der Vorlast unabhängig sind, sogenannte „*load independent*“-Parameter, wodurch die hämodynamische Situation unabhängig vom Volumen des Herz-Kreislaufsystems beurteilt werden kann. Das ist von Bedeutung, weil zum Beispiel der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP), ein wichtiger konventioneller Parameter der diastolischen Funktion, abhängig von der Volumensituation im Herz-Kreislauf ist. Aufgrund des veränderbaren LVEDP ist deshalb ein nur durch die Druck-Volumen-Messung erfassbarer Parameter wichtig, nämlich die enddiastolische Druck-Volumen-Relation (EDPVR). Die EDPVR ist ein Parameter, der die passive Steifigkeit des linken Ventrikels während der Diastole erfasst. Diese Druck-Volumen-Beziehung ermöglicht es, die Dehnbarkeit des linken Ventrikels während der Blutfüllung in der Diastole zu charakterisieren. Bei Patienten mit einer HFNEF zeigt sich in den Druck-Volumen-Kurven ein normales oder leicht vermindertes enddiastolisches Volumen (EDV) mit einem Anstieg des LVEDP. Dies verursacht eine Anhebung und Linkswanderung der Druck-Volumen-Kurve [31]. Durch zusätzliche Messung der isovolumetrischen Relaxationszeit, zusammen mit dem LVEDP, sind diastolische Funktionsstörungen genauer zu beurteilen. Es konnte aber gezeigt werden, dass die Genauigkeit der Parameter zur Bestimmung einer HFNEF in der echokardiographischen Untersuchung mit weniger Fehlern behaftet ist, und auch eine verminderte Anzahl falsch-positiver Aussagen als bei einer Herzkatheteruntersuchung auftreten [10].

1.3. Herzzyklus

Die Depolarisation des Myokards löst eine mechanische Kontraktion des Herzmuskels aus (Systole), der eine Erschlafungsphase der Muskulatur (Diastole) folgt. Die Systole treibt das Blut durch die Semiulnarklappen von Aorta und Pulmonalarterien in den Herz- bzw. Lungenkreislauf. In der Diastole strömt das Blut durch die Atrioventrikularklappen vom linken Vorhof durch die Mitralklappe und vom rechten Vorhof durch die Trikuspidalklappe in den linken bzw. in den rechten Ventrikel ein. Die Herzklappen haben eine Ventilwirkung und ihre Öffnungs- und Verschlussbewegung garantieren einen adäquaten Fluss im Kreislaufsystem. Ihre Öffnung wird allein durch den Blutfluß und nicht durch die Papillarmuskeln bewirkt. Bei der mechanischen Herzaktion unterscheidet man in der Systole eine Anspannungsphase von einer Austreibungsphase, die Diastole wird in Entspannungs- und Füllungsphase unterteilt. In der Anspannungsphase steigt der intraventrikuläre Druck steil an und führt zu einem passiven Verschluss der AV-Klappen. Bei geschlossenen Klappen kontrahiert sich der Ventrikel isovolumetrisch. Sobald der LV-Druck den diastolischen Aortendruck von ca. 80 mmHg übertrifft, öffnen sich die Taschenklappen und die Austreibungsphase beginnt. In Ruhebedingungen werden ungefähr 50% des diastolischen Volumens in die Aorta ausgeworfen. Die Austreibungsphase endet mit dem Schluß von Aorten- und Pulmonalklappe. Die Diastole beginnt mit einer isovolumetrischen Entspannungsphase, in der alle vier Klappen des Herzens geschlossen sind. Der Druck im linken Ventrikel wandert gegen Null und fällt unter den Vorhofdruck. Aufgrund des Druckabfalls öffnen sich die AV-Klappen, Blut strömt aus den Vorhöfen in die Kammern. Damit beginnt die Füllungsphase. Der zunächst rasche Bluteinstrom verlangsamt sich. Die Kontraktion des Vorhofs führt nochmals zu einer Steigerung des Blutflusses in den Ventrikel. In Ruhe macht die atriale Kontraktion nur 8% des enddiastolischen Volumens aus. Bei körperlicher Belastung liegt jedoch der Beitrag der Vorhofkontraktion deutlich höher [54]. Aus dem so aufgezeichneten Herzzyklus können wesentliche Parameter analysiert werden. So kann neben konventionellen Druckparametern auch direkt das kardiale Volumen gemessen werden, wodurch genaue Aussagen über das Schlagvolumen, das Herzzeitvolumen und die Ejektionsfraktion getroffen werden können. Das Herzzeitvolumen ist ein wichtiger Indikator für die

Pumpfunktion des Herzens und lässt sich aus dem Produkt von Schlagvolumen und Herzfrequenz berechnen.

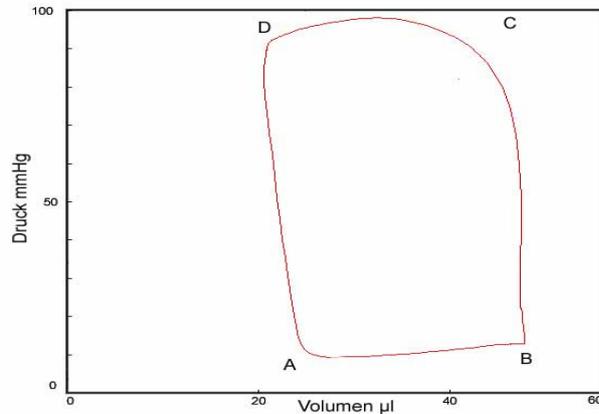


Abb.4: Druck-VolumenKurve während eines Herzzyklus:

A) Öffnung der Mitralklappe, B) Schluss der Mitralklappe, C) Öffnung der Aortenklappe, D) Schluss der Aortenklappe

Dabei ist die Pumpfunktion des Herzens abhängig von der Kontraktilität (Inotropie), der Nachlast und der Herzfrequenz [55]. Die Inotropie des Herzens wiederum ist abhängig von der Vorlast (Frank-Starling-Mechanismus), der Frequenz (Bowditch-Effekt) und der sympathoadrenergen Aktivierung. Der Frank-Starling-Mechanismus beschreibt die Beziehung zwischen dem linksventrikulärem enddiastolischen Druck und dem Schlagvolumen. Nach dieser Kraft-Spannungs-Beziehung führt ein Anstieg des Füllungsdrucks über eine vermehrte Vordehnung des Ventrikels zu einer Zunahme der Muskelfaserverkürzung und damit zu einer Anhebung des Schlagvolumens.

Durch die Konduktanzmessung ist es nun möglich, eine Aussage über den linksventrikulären Druck und das linksventrikuläre Volumen zu machen. Diese Aussage könnte allerdings auch durch eine kombinierte Untersuchung einer konventionellen Druckmessung und einer Echokardiographie gemacht werden.

Der wesentliche Vorteil dieser Druck-Volumen Kurven ist ein anderer. Während der Aufzeichnung der Druck-Volumen Kurven können durch eine kurzfristige Senkung der Vorlast auch „load-independent“ Parameter erfasst werden, also Werte, die von der kardialen Vorlast unabhängig sind. So kann die hämodynamische Situation noch besser und unabhängig von der aktuellen Volumensituation des Herz-Kreislaufsystems untersucht werden. Das ist besonders wichtig, weil der linksventrikuläre enddiastolische Druck

(LVEDP) ein wichtiger konventioneller Parameter der diastolischen Funktion, abhängig von der Volumensituation im Kreislauf ist. Hierdurch steht ein nur durch die Druck-Volumen Messung erfassbarer Parameter im Vordergrund: die enddiastolische Druck Volumen Relation (EDPVR) [56]. Die EDPVR ist ein Parameter, der die passive Steifigkeit des linken Ventrikels während der Diastole erfasst. Diese Relation gibt damit eine direkte Information über die Dehnbarkeit des linken Ventrikels durch die Blutfüllung während der Diastole.

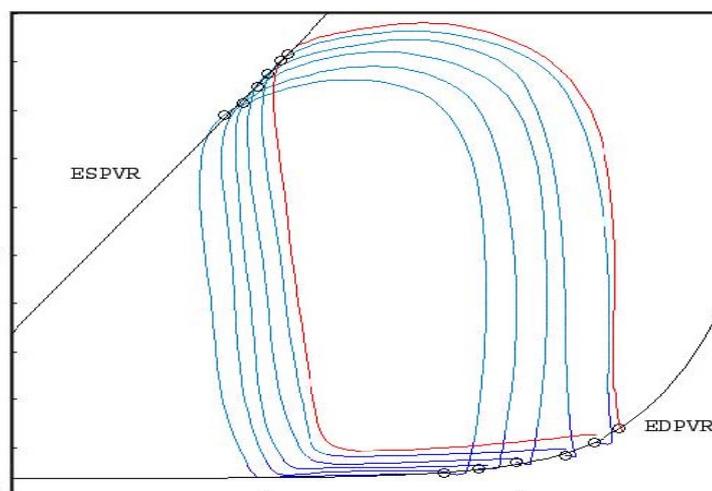


Abb. 5: Druck-Volumen Kurve während einer Vorlastreduktion mit eingezeichnetem EDPVR (eigene Aufzeichnung)

1.4. Pathologie der diastolischen Dysfunktion

Ursachen, die für die Entwicklung einer diastolischen Funktionsstörung verantwortlich sind, können in myokardiale und extramyokardiale Fehlmechanismen eingeteilt werden und sind innerhalb einer Herzmuskelzelle, in der umgebenden extrazellulären Matrix oder in Form einer neurohumoralen Systemaktivierung zu finden [31]

1.4.1. Kardiomyozyt

Die Kardiomyozyten enthalten die Myofibrillen, deren kleinste Baueinheit das Sarkomer bildet. Im Sarkomer existieren Proteine wie Titin, das sich als großes Protein von der Z-Bande bis zur M-Linie des Sarkomers spannt [57-60]. Über die physiologische Sarkomerlänge hinaus, bestimmen die im Sarkomer enthaltenen Proteine die Steifheit des Myokards in der Diastole [61]. Das im Sarkomer enthaltene Titin ist dabei hauptsächlich für die Elastizität des Kardiomyozyten verantwortlich. Die elastischen Eigenschaften des Sarkomers befinden sich dabei an der I-Bande. Titin wird in verschiedenen Isoformen exprimiert, die für unterschiedliche mechanische Eigenschaften verantwortlich sind. Es wird vermutet, dass dieses Protein eine entscheidende Rolle für die Veränderung der passiven Steifheit im insuffizienten Herzen spielt [62,63]. Es sind hauptsächlich zwei Isoformen bekannt:

- N2B: ein kurzes Segment mit geringerer Dehnbarkeit und erhöhter passiver Steifheit
- N2BA: ein langes Segment mit einer hohen Anzahl an Immunglobulinen und größerer Längenveränderung und Dehnbarkeit

Es konnte gezeigt werden, dass besonders in großen Tieren vermehrt Titin der Isoform N2BA zu finden ist [64]. Während der Systole wird Titin komprimiert und gewinnt Energie, die es während der Diastole aufwendet, um, ähnlich einer elastischen Feder, das Myokard auf seine ursprüngliche Länge zurückzuführen [59,65]. Die Expression der Titin-Isoformen zeigen beim gesunden Herzen keinen Unterschied. Im experimentellen Endstadium einer dilatativen Kardiomyopathie konnten mit Hilfe von Myokardbiopsien Veränderungen der Titin-Isoformen festgestellt werden, die mit einer Zunahme der Steifigkeit des Myokards korrelierten [59]. Veränderungen der Titin-Isoformen sind somit eine mögliche Ursache, die diastolische Funktion des linken Ventrikels zu beeinflussen [66].

1.4.2. Extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix ist kein statisches Modell, sondern eher eine dynamische Einheit, die eine grundlegende Rolle in der diastolischen Funktion darstellt. Eine der Aufgaben des kardialen Bindegewebes besteht darin, dass die Herzmuskelzelle bei Pumpfunktion nicht überdehnt und auch nicht auseinander gleitet. Dabei setzt sich das Bindegewebe aus Kollagenfasern zusammen, die elastisch (Kollagen III) oder sehr fest, steif und Stahl-ähnlich sein können (Kollagen I). Die myokardiale extrazelluläre Matrix besteht aus wichtigen Bestandteilen zu denen fibrilläre Proteine wie Kollagen Typ I, Kollagen Typ III gehören [67-69]. Dabei können der Aufbau, die Bestandteile, der Grad der Vernetzung, der Quotient von Kollagen I zu Kollagen III oder der Kollagenstoffwechsel verändert sein [70,71]. Fibroblasten sind einer der häufigsten Zelltypen im Myokard und für die Synthese des Kollagens verantwortlich. Sie reagieren sowohl auf physikalische als auch auf biochemische Reize und können schnell proliferieren. Der arterielle Hypertonus als solch ein physikalischer Reiz verursacht durch Druckbelastung des Herzens in den Fibroblasten eine gesteigerte Kollagenbiosynthese mit vermindertem Abbau von Kollagen und führt dadurch zur verstärkten kardialen Fibrose [72]. Dagegen wird der Abbau von Kollagen durch Zink-abhängige Enzyme, die sogenannten Metalloproteasen (MMP), beeinflusst, die ebenfalls in Fibroblasten gebildet werden [73-76]. Die Aktivität und Konzentration der MMPs wird sowohl durch Zytokine als auch durch natriuretische Peptide (ANP, BNP) modifiziert, die wiederum von den Fibroblasten selbst ausgeschüttet werden. Diese Signalmoleküle führen einerseits zu einer verminderten Synthese von Kollagen in den Fibroblasten selbst und andererseits, aufgrund der erhöhten Expression von Kollagen-abbauenden Enzymen und damit einer erhöhten Konzentration der MMPs, zu einem verstärkten Abbau von Kollagen [38,77,78]. Auch bei oxidativem Stress ist eine Induktion Kollagen-Abbauender Enzyme in den Fibroblasten zu finden [72]. Besonders bei Patienten mit hypertensiver Herzerkrankung aber auch Patienten mit einer diabetischen Kardiomyopathie und Zustand nach kardialer Biopsie konnten erhöhte Konzentrationen an Kollagen I gefunden werden [79],[38]. Deshalb werden sowohl ein Wechsel der Kollagenarten als auch Veränderungen der Kollagensynthese und ein möglicherweise gestörter Abbau von Kollagen für den physiologischen oder pathologischen Umbau des

Myokards im Zusammenhang mit der Entwicklung einer diastolischen Dysfunktion vermutet [38,72,73,80,81].

1.4.3. Neurohumorale Aktivierung

Zur neurohumoralen Aktivierung werden unter anderem

- natriuretischen Peptide
- Stickstoffmonoxid (NO)
- Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS),
- Endothelin,

dazugezählt [31].

1.4.3.1. Natriuretische Peptide

Zu den wichtigsten natriuretischen Peptiden (NP) gehören ANP und BNP. Das atriale-natriuretische-Peptid (ANP) wird in den Kardiomyozyten des Atriums gebildet. Das brain-natriuretische-Peptid (BNP) wird von den Kardiomyozyten des Ventrikels und des Atriums produziert. Die Hormone ANP und BNP werden hauptsächlich durch mechanische Dehnung des Myokards sekretiert und besitzen inhibierende Effekte gegenüber dem Renin-Angiotensin-Aldosteron System (RAAS) mit verminderter Sekretion von Aldosteron aus der Nebennierenrinde und Renin aus der Niere. Die natriuretischen Peptide erhöhen konzentrationsabhängig die glomeruläre Filtration, steigern die Diurese mit gleichzeitig verminderter Retention von Natrium und inhibieren die Sekretion und die kardiale Synthese von Katecholaminen [82-87], Ausserdem besitzen ANP und BNP antihypertrophe Eigenschaften und wirken aufgrund hemmender Effekte auf die Kollagensynthese in den Fibroblasten antifibrotisch [88,89]. In Studien konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit klinischen Zeichen einer Herzinsuffizienz eine vermehrte Konzentration an ANP und

BNP gemessen werden kann [90]. Neben der dehnungsinduzierten existiert aber auch eine basale Freisetzung von ANP. Dieser Prozess wird durch verschiedenste Plasmafaktoren wie zum Beispiel Angiotensin II und Noradrenalin stimuliert. Dabei entfalten die natriuretischen Peptide ihre Wirkung über Bindung an NP-Rezeptoren. Als ebenfalls positive Eigenschaft ist die durch ANP und BNP gesteigerte eNOS-Expression zu erwähnen, die zu einer gesteigerten Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) führt [91]. BNP stellt zugleich laborchemisch einen guten Marker im klinischen Alltag dar um den Verlauf einer HFNEF zu beurteilen. Denn je schwerer der Grad einer diastolischen Dysfunktion, desto höher der messbare BNP-Spiegel im Blutplasma [92],[93]. Weiterhin findet die Bestimmung des BNP-Spiegels bei Patienten mit Dyspnoe Anwendung um eine mögliche pulmonale Ursache als Grund für die Symptomatik auszuschließen [94]. Die Bestimmung von BNP ist jedoch keine Primärdiagnostik zur Differenzierung zwischen einer systolischen- oder diastolischen Herzinsuffizienz, aber hohe Werte an BNP korrelieren mit einer erhöhten Mortalität [95].

1.4.3.2. NO-System

Das Molekül Stickstoffmonoxid (NO) wurde erstmals von Furchgott et al. 1970 beschrieben, die eine von Endothelzellen ausgeschüttete instabile Substanz bemerkten, die zur Gefäßerweiterung führte. Nach der weiteren Charakterisierung durch Palmer et al. 1987 als endothelial deriving relaxing factor (EDFR), stellt NO eines der wichtigsten Signalmoleküle im menschlichen Körper dar und ist in zahlreiche physiologische und pathophysiologische Prozesse im Herz-Kreislaufsystem involviert [96]. Aus der Aminosäure L-Arginin entsteht beim Vorhandensein von NADPH und Sauerstoff das L-Citrullin und NO [96]. Bislang sind drei Isoenzyme bekannt, die aus verschiedenen Geweben isoliert wurden und daher als neuronale (nNOS), endotheliale (eNOS), und induzierbare (iNOS) NO-Synthasen bezeichnet werden [97].

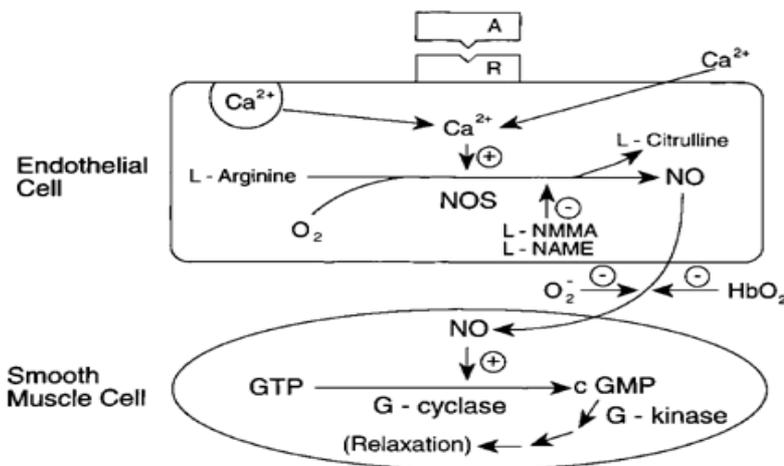


Abb. 6: NO-Synthese, Nathan et al., 1994 [96]

Die iNOS ist besonders in Makrophagen, Endothelzellen, Kardiomyozyten, Fibroblasten und in glatter Gefäßmuskulatur zu finden [98]. Die Aktivität der iNOS wird durch Entzündung oder Infektion beeinflusst. Sowohl die Entzündung als auch die Infektion, die durch die erhöhte Konzentrationen an Inflammationsmarkern getriggert werden, steigern die iNOS-Aktivität und führen damit zu einer vermehrten Sekretion von NO, das zytotoxische Konzentrationen erreichen kann. Zu diesen Inflammationsmarkern gehören bakterielle Lipopolysaccharide (Endotoxine) und Zytokine. Als Beispiele der Zytokine sind Interleukin-1, IFN- α , TNF- α und TNF- β zu nennen [96]. Das kardiale und vaskuläre Endothel, das Endothel der Niere, das skelettale Muskelgewebe, der sinusatriale- und atrioventrikuläre-Knoten und die Kardiomyozyten als auch einige Blutzellen enthalten die endotheliale NO-Synthase (eNOS) [99,100]. Die Aktivität von eNOS kann ebenfalls infolge neurohumoraler Faktoren beeinflusst werden. Diese Faktoren sind zum Beispiel Katecholamine oder ANP und BNP [91,101]. Ausserdem ist die eNOS-Expression bei erhöhtem Wandstress aufgrund arteriellen Hypertonus bedingten Druckes und Volumenbelastung des Herzens unter Hypoxie und bei erhöhter Herzfrequenz gesteigert [102],[103],[104]. Dagegen führt die Progression einer Herzinsuffizienz zu einer verringerten NO-Freisetzung, die vermutlich auf einer verminderten Synthese und Expression durch die eNOS beruht [105,106]. Denn eine Studie mit eNOS-Knockout-Mäusen konnte zeigen, dass durch eine verringerte eNOS-Expression das ventrikuläre

Remodelling verstärkt und die Entstehung einer Herzinsuffizienz begünstigt werden [107]. Es gibt aber auch Pharmaka, die eine Aktivierung der eNOS verursachen. In klinischen Studien wie der *SENIORS*-Studie wurde eine verstärkte eNOS-Aktivierung mit erhöhter Bioverfügbarkeit an NO unter der Therapie mit dem β -Blocker Nebivolol festgestellt [108]. Die Wirkung von NO ist in verschiedenen Studien untersucht worden. Folgende Merkmale von NO konnten gezeigt werden:

- NO wirkt antihypertroph [109]
- NO wirkt antiproliferativ [110]
- NO wirkt antifibrotisch [111]
- NO wirkt über die Aktivierung der Guanylcyclase mit Erhöhung des c-GMP-Spiegels und führt zu einer Relaxation der glatten Muskulatur. Die Folgen sind [112-114]:
 - eine Vasodilatation,
 - eine Abnahme der myokardialen Steifigkeit,
 - eine Abnahme der Kontraktilität und
 - eine Zunahme der diastolischen Zelllänge.

Das Molekül NO zeigt aber auch konzentrationsabhängig unterschiedliche Wirkungen:

- physiologische Konzentrationen an NO zeigen einen positiven inotropen Effekt
pathologische Konzentrationen an NO zeigen einen negativen inotropen Effekt [115],
- physiologische Konzentrationen von NO vermindern die Apoptose,
pathologische Konzentrationen wirken proapoptotisch und zytotoxisch [116],
- physiologische Konzentrationen von NO erhöhen die β -adrenerge Wirkung [117],
pathologische Konzentrationen an NO inhibieren die β -adrenerge Wirkung [118].

Bei Patienten mit normaler LVEF und klinischen Zeichen einer Herzinsuffizienz konnte durch Applikation eines Präparates, das intrakoronares NO freisetzt, eine Reduktion sowohl des LVEDP als auch eine Verbesserung der diastolischen Dehnbarkeit des Myokards demonstriert werden [113]. Es ist zu erwähnen, dass bei herzinsuffizienten

Patienten eine erhöhte Konzentration an Inflammationsmarkern und insbesondere TNF - α gemessen werden kann. Die Folge dieser Entzündungsmediatoren ist eine Aktivierung der iNOS, die bei einem dauerhaften aktivierten Zustand pathologische Konzentrationen an NO produziert und zu einer verminderten Expression der eNOS führt. Eine Ineffektivität der eNOS ist ebenfalls bei Erkrankungen wie Diabetes mellitus oder arteriellen Hypertonus zu beobachten. Auch mit zunehmendem Alter wird eine geringere NO-Produktion vermutet, so dass zusammenfassend Veränderungen der NO-Synthese in ihrer Expression als auch in ihrer Aktivität zu einer diastolischen Funktionsstörung führen können.

1.5. Pharmakotherapie

Trotz der klinischen Relevanz der HFNEF stehen bis heute nur wenige placebokontrollierte Studien zur Behandlung zur Verfügung. Primär wurden Medikamente für Patienten mit systolisch eingeschränkter Pumpfunktion entwickelt und etabliert, die zu einer nachweisbaren Reduktion der klinischen Symptomatik und zum Teil zur Senkung der Mortalität führen und eine Klasse I Empfehlung der *deutschen Gesellschaft für Kardiologie* zur Behandlung der Herzinsuffizienz darstellen. Trotz der unterschiedlichen Pathophysiologie der systolischen- und diastolischen Herzinsuffizienz werden aber beide mit den gleichen Wirkstoffgruppen behandelt. Ein wichtiges therapeutisches Ziel bei beiden Erkrankungen ist die Verhinderung der Myokardhypertrophie. Eine große Bedeutung stellen in diesem Fall die AT1-Antagonisten und ACE-Hemmer dar, die durch Hemmung des RAAS-Systems die Hypertrophie verhindern und sogar zu einer Regression des Herzgewichts und der kardialen Fibrose führen [38]. Für den ACE-Hemmer Enalapril konnte in Nachstudien der SOLVD - Studie eine verbesserte Morbidität bei Patienten mit klinischen Symptomen festgestellt werden. Jedoch zeigte Enalapril keinen Einfluß auf die Mortalität [119]. Auch für Candesartan, ein AT1-Antagonist, konnte im *CHARM-Preserved*-Studien-Arm bei Patienten mit HFNEF eine Verringerung der Mortalität und Hospitalisationsrate von 11% nach 36 Monaten nachgewiesen werden. Dies war eine der ersten großen Studien zur HFNEF [38,120]. Jedoch verfehlen die Ergebnisse knapp die Signifikanzgrenze, so dass weitere Studien notwendig sind um diesen positiven Trend zu

bestätigen. Der Einsatz der Medikamentengruppe der Aldosteron-Antagonisten, die ebenfalls antifibrotische Effekte besitzen, erscheint sinnvoll und wird zur Zeit an Patienten mit HFNEF überprüft [121,122]. Als weitere Therapiemöglichkeiten haben sich die β -Blocker etabliert, die durch eine Herzfrequenzsenkung und durch die Blockade der adrenergen Stimulation wirken. Für Nebivolol konnte in der *SENIORS*-Studie eine Senkung der Morbidität und Mortalität besonders bei älteren Patienten mit HFNEF analysiert werden [123]. Vor allem profitierte das weibliche Geschlecht von diesem Medikament. Zusätzlich wurde erkannt, dass Nebivolol zu einer Aktivierung der eNOS mit nachgewiesener Bioverfügbarkeit von NO führt. Es ist aber nicht geklärt, ob dies eine spezifische Wirkung dieses Wirkstoffes oder der gesamten Wirkstoffklasse darstellt. Die Gruppe der Kalziumantagonisten kann bei Patienten mit arteriellem Hypertonus das Herzgewicht reduzieren und verbessert die Belastungstoleranz [124]. Die Substanzklasse der Diuretika ist durch ihre gesteigerte neurohumorale Aktivierung nicht Mittel der Wahl zur Langzeittherapie und Mortalitätsreduktion einer HFNEF. Die Diuretika haben aber in der Klinik ihren Stellenwert, da sie die klinischen Symptome schnell und effektiv reduzieren [122]. Eine neue Therapieoption ist die Medikamentengruppe der Cholinesterasehemmer. Dabei konnte Fukuta mit seiner Arbeitsgruppe rückwirkend eine Mortalitätssenkung bei Patienten mit HFNEF und Behandlung mit HMG-Co-Reduktase-Hemmern feststellen. Dies wird auf pleiotrophe Effekte der Cholinesterasehemmer zurückgeführt, die möglicherweise zu einer gesteigerten eNOS-Aktivierung führen [108]. Es existiert aber bis heute kein Medikament, das durch eine direkte Aktivierung der eNOS wirkt.

1.7. Aufgabenstellung

Die Diagnose als auch Therapie einer diastolischen Herzinsuffizienz gewinnt zunehmend an Relevanz im klinischen Alltag. Die Bedeutung dieser Erkrankung konnte in Studien mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität dargestellt werden [3]. Ebenfalls zeigen Studien, dass besonders der arterielle Hypertonus eine entscheidende Rolle für die Entwicklung einer diastolischen Dysfunktion spielt [31]. Zur Untersuchung einer arteriellen Hypertonus

induzierten diastolischen Dysfunktion eignet sich das etablierte Dahl-Salz-sensitive-Rattenmodell. Es ist nicht nur ein klassisches Modell der Hypertonieforschung [125]. Es hat sich ebenfalls als Tiermodell zur Untersuchung einer Herzinsuffizienz etabliert [126]. Es konnte in experimentellen Arbeiten beobachtet werden, dass die Art der Funktionsstörung einen zeitlichen Verlauf zeigt, und bei den hypertensiven Dahl-Ratten eine zuerst beginnende diastolische Dysfunktion auftritt, und im weiteren Krankheitsverlauf systolische Pumpfunktionsstörungen mit einer eingeschränkten LV-Funktion messbar sind [127]. Auf dieser Grundlage konnte in tierexperimentellen Studien mit diesem Tiermodell nicht nur das Verständnis für die Pathologie einer Herzinsuffizienz und in dieser Hinsicht der diastolischen Dysfunktion erweitert werden. Es konnten gezielt Veränderungen in den Kardiomyozyten selbst als auch in der sie umgebenden ECM und der neurohumoralen Aktivierung des Herz-Kreislaufsystems untersucht und gefunden werden, die zu einer verminderten Dehnbarkeit und zunehmender LV-Steifheit führen [125,126,128]. Aufgrund der zunehmenden klinischen Relevanz hat die diastolische Herzinsuffizienz zunehmend an Bedeutung gewonnen. Es werden in diesem Zusammenhang klinische als auch experimentelle Studien durchgeführt um mögliche Therapiestrategien zu überprüfen. Dabei wurden Medikamente verwendet, die in der Herzinsuffizienztherapie etabliert sind und aufgrund ihrer antihypertrophen und antifibrotischen Eigenschaften eingesetzt werden [129][37,129]. In neueren Arbeiten mit dem Dahl-Salz-sensitiven Rattenmodell wird den Tieren über die Injektion von Streptozin ein zusätzlicher Diabetes mellitus induziert. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich bei diesen Tiergruppen eine raschere Progression und Manifestierung einer diastolischen Funktionsstörung gegenüber den Kontrolltieren entwickelte [83]. Aufgrund unserer gezielten Fragestellung als auch der Etablierung dieses Tiermodells zur Untersuchung der diastolischen Herzinsuffizienz eignet sich das Dahl-Salz-sensitive Rattenmodell für unsere tierexperimentelle Studie. Die Tiere entwickeln unter einer speziellen Salzkost einen arteriellen Hypertonus. Der Einsatz hämodynamischer Messungen ermöglichte es eine diastolische Dysfunktion zu beobachten und zu diagnostizieren. Wir wollen in Verlaufsbeobachtungen mit Echokardiographie den Zeitpunkt finden, bei dem die Tiere nach den Diagnosekriterien der *European Society of Cardiology* eine isolierte diastolische Funktionsstörung mit einer normalen systolischen Pumpfunktion mit LVEF über 50% zeigen. Abschließend erfolgte eine Koduktanzmessung mit einem

Linksherzkatheter. Dabei werden Druck-Volumen Kurven graphisch dargestellt, die zur weiteren Auswertung genutzt werden. Die Organe der Tiere wurden zur weiteren molekularbiologischen und histologischen Untersuchungen aufgearbeitet. Die Fragestellung lautete:

- Entwickeln die Dahl-Salz-sensitiven Ratten einen arteriellen Hypertonus?
- Führt der arterielle Hypertonus zu einer diastolischen Dysfunktion?
- Ist es möglich nach den Leitlinien der *Society of Cardiology* eine HFNEF zu diagnostizieren?
- Kann bei den hypertensiven Tieren eine Relaxationsstörungen mit zunehmender LV-Steifheit und verminderter LV-Dehnbarkeit in hämodynamischen Messungen bestätigt werden?
- Ist es möglich mit dem Vorlast-unabhängigen Parameter die enddiastolische Druck-Volumen-Beziehung (EDPVR), eine diastolische Dysfunktion zu charakterisieren?
- Entwickeln die hypertensiven Tiere über den Studienzeitraum eine konzentrische Myokardhypertrophie mit zunehmenden Herzgewicht und einem erhöhten linksventrikulären Hypertrophieindex (LVH-Index)?
- Ist es möglich mit Picro-Sirius-Rotfärbung (PSR-Färbung) eine vermehrte kardiale Fibrose bei den hypertensiven Tieren darzustellen?

Wir haben in unserer Studie einen Prototyp eines Medikamentes S803 genutzt, welches über eine pharmakologische Stimulierung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase mit einer gesteigerten eNOS-Genexpression wirkt [130].

- Führt eine pharmakologische Stimulation der eNOS mit erhöhter physiologischer Konzentration an NO zu einer Besserung der diastolischen Dysfunktion im hypertensiven Dahl-Salz-Rattenmodell?
- Ist es möglich den antihypertrophen und antifibrotischen Effekt von NO aufgrund einer gesteigerten pharmakologischen Stimulation der eNOS darzustellen?
- Ist ein eNOS-enhancer eine möglich zukünftige Therapiestrategie zur Behandlung einer diastolischen Dysfunktion?

2. Material und Methodik

Die für diese Promotion stattgefundenen Versuche an lebenden Wirbeltieren für das Versuchsvorhaben 0180/04 erfolgten nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes. Die Genehmigung zur Durchführung der Versuche wurde am 01.04.2004 erteilt. Das in dieser Arbeit genutzte experimentelle Tiermodell wurde nach den bestimmenden Richtlinien des *Deutschen Ethikrates* und der US-Gesundheitsbehörde *NIH* und unter Beobachtung der Ethikkommission des *UKBF* angewandt.

2.1 Studiendesign

Vor Beginn der Studie wurden die Tiere randomisiert und in verschiedene Gruppen eingeteilt.

1. KON: 20 Dahl sensitive Ratten, Normalkost, Placebo
2. KONE_{NOS}: 20 Dahl sensitive Ratten, Normalkost, eNOS-enhancer S803
3. HFNEF: 20 Dahl Salz sensitive Ratten, Salzdiät, Placebo
4. HFNEF_{eNOS}: 20 Dahl Salz sensitive Ratten, Salzdiät, eNOS-enhancer S803

Je nach Gruppeneinteilung erhielten die Tiere im Zeitraum von acht Wochen eine Salzkost oder Normalfutter. Die Gruppen KONE_{NOS} und HFNEF_{eNOS} wurden mit dem Prototypen eines Medikamentes S803– ein eNOS-enhancer – in der Dosierung 10mg/kg Körpergewicht mit der Einnahmezeit 0-0-1 behandelt. Die anderen Gruppen erhielten ein Placebo bestehend aus Hydroxyethylstärke (HES). Nach Beginn der Salzbehandlung wurde in der 4- und 8-Woche der Verlauf durch Echokardiographie dokumentiert. Die abschließende Linksherzkatheteruntersuchung erfolgte mit einem Miller-Tip-Konduktanz-Katheter nach der achten Behandlungswoche und wurde bei allen Gruppen durchgeführt. Nach der Untersuchung erfolgte eine Obduktion der Tiere um spezielle Organe zur weiteren Aufarbeitung zu entnehmen und in flüssigen Stickstoff zu konservieren. Die Lagerung der Präparate erfolgte bei - 80°C.

2.2. Rattenstämme

Die Dahl Salz-sensitiven Ratten wurden von L. Dahl aus normotensiven Sprague-Dawley-Ratten gezüchtet [131]. Neben der genetischen Prädisposition entwickelt dieser Stamm aufgrund externer Bedingungen einen arteriellen Hypertonus. Aus der Züchtung sind zwei genetisch homogene Stämme hervorgegangen, die als SS/Jr (salzsensitiv), SR/Jr (salzresistent) bezeichnet werden. Die Dahl-Salz-sensitiven Ratten entwickeln – gegenüber den Salz-resistenten Ratten – nach einer Salz-Ernährung einen arteriellen Hypertonus mit den Folgeerscheinung einer Myokardhypertrophie, und aufgrund einer sich entwickelnden Herzinsuffizienz eine pulmonale Stauung mit erhöhten enddiastolischen Drücken (LVEDP) [132]. Die Ursache für die erhöhte Salzempfindlichkeit ist nicht vollständig geklärt. Es wird einerseits eine genetische Veränderung im ANP-System bei den Dahl-Salz-sensitiven Ratten vermutet, die – im Vergleich mit den Dahl-Salz-resistenten Ratten mit erhöhtem ANP-Plasmaspiegel – zu einer Minderung der Volumenelimination führt [133]. Eine weitere Erklärung wird in der unterschiedlichen Response der renalen und extra-renalen Gefäßmuskulatur auf verschiedene hormonelle Vasokonstriktoren und -dilatatoren wie ANP, NO, Angiotensin-2 und Endothelin-1 vermutet [134]. Auch ein erhöhter Sympathikotonus mit erhöhten Noradrenalin-Konzentrationen, der einen erhöhten peripherem Gefäßwiderstand verursacht, kann verantwortlich für die Entwicklung eines arteriellen Hypertonus sein [135]. Eine weitere Möglichkeit ist eine gesteigerte Chlorid-Ionen-Rückresorption an der Henle-Schleife bei den Salz-sensitiven Tieren. Die hypertensiven Dahl-Ratten stellen dabei ein klassisches Modell in der Hypertonieforschung dar [136].

2.3. Pharmakologische Behandlungen

Die Substanz S803 ist ein eNOS-enhancer, der vermutlich zu einer verstärkten Transkription und Expression von eNOS führt. S803 ist eine vollsynthetische Entwicklungssubstanz, die aus einem Screening-Verfahren gewonnen wurde. Aus patentrechtlichen Gründen wurde S803 in verschiedenen Studien auf seine Fähigkeit, die

eNOS-Expression zu steigern, überprüft. Über eine Erhöhung der Luciferase-Expression konnte eine eNOS-Expressionssteigerung nach Behandlung mit S803 indirekt in einem Zelltest mit transfizierten Zellen, bei denen das Enzym Luciferase an das eNOS-Promotorgen gekoppelt war, nachgewiesen werden ($EC_{50} = 0,409 \mu\text{M/l}$). In einer weiteren Studie mit humanen Nabelschnurzellen („*human umbilical endothelial cells*“, HUVECs) konnte eine Steigerung der eNOS-Expression durch Behandlung mit S803 bestätigt werden. Dabei wurden HUVECs mit S803 inkubiert und mittels eines spezifischen Western-Blots eine erhöhte eNOS-Proteinexpression nachgewiesen ($EC_{50} = 0,3-1 \mu\text{M/l}$). Eine andere Studie zeigte, dass der eNOS-Transkriptionsverstärker die zelluläre Transkription in der humanen Endothelzelllinie EA.hy 926 aktiviert und zu einer erhöhten NO-Produktion in humanen Endothelzellen führt (Wohlfart et al., unpublished). Die Behandlung von knochenmarksständigen mononuklearen Zellen mit einem Strukturderivat dieser Substanz konnte bereits *ex vivo* über eine Erhöhung der eNOS die Funktionalität dieser Zellen steigern [130]. Dagegen zeigte die Behandlung einer stabilen Zelllinie ohne Endothel mit S803 keine erhöhte eNOS-Expression. Diese Studien zeigen deutlich, dass der eNOS-Transkriptionsverstärker selektiv zu einer Steigerung der eNOS führt, ohne dabei die iNOS- oder nNOS-Expression zu erhöhen. Es konnte gezeigt werden, dass diese Wirkstoffkonzentration den arteriellen Blutdruck bei gesunden Ratten nicht beeinflusst. Die Tiere mit medikamentöser Behandlung erhielten S803, bei einer Dosierung von 10mg/kg Körpergewicht, per gavage einmal pro Tag (0-0-1) für die Dauer von acht Wochen. Das Studienmedikament S803 wurde zuvor mit HES 0,2 ml (Hydroxyethylstärke) für eine Stunde mit einem Rührfisch gelöst. Mit einer Heparinspritze wurde der gelöste Wirkstoff S803 direkt in den Magen appliziert. Diese Art der Medikamentengabe ist genauer als über das Trinkwasser, weil Wasservolumen und Pharmakonlösung variieren können. Die unbehandelten Tiere erhielten als Scheinmedikation 0,2 ml HES als Placebo um eine mögliche Beeinflussung durch diese Applikationsform zu verringern, und weil HES die Ansatzlösung für S803 darstellt. .

2.4. Tierhaltung

Über den gesamten Zeitraum dieser Studie befanden sich die Tiere in einem Tierstall der Sicherheitsstufe S1. Die Tiere wurden in einem „Makrolonkäfig“ des Typs II, der mit staubfreiem Weichholzgranulat ausgelegt wurde, gehalten. In den mit Überdruck geschlossenen Räumen gab es eine konstante Raumtemperatur von 20°C und eine Luftfeuchtigkeit von 50-60%. Die Raumbelichtung wechselte in einem 12-Stunden-Hell-Dunkel-Rhythmus. Vor dem Betreten der Räume fand eine Händedesinfektion statt und es wurden Mundschutz, Kittel, Haube und Handschuhe angelegt. Die Tiergruppen mit Salzdiät bekamen als Futter Altromin Hochsalz 1324 mit 8% Salzgehalt, die Tiere mit Normalkost wurden mit Altromin 1324 Alleinfutter (Altromin GmbH, Lage) ernährt. Alle Ratten erhielten Leitungswasser zu trinken. Bei Ankunft hatten die Tiere ein Alter von 3-4 Wochen. Das durchschnittliche Körpergewicht betrug 180g. Der Gesundheitszustand der Tiere wurde täglich durch Pflegepersonal beobachtet und durch veterinärmedizinische Kontrollen einmal monatlich bestätigt.

2.5. Hämodynamik

2.5.1. Echokardiographie

Die Echokardiographie ist eine Ultraschalluntersuchung des Herzens. Sie stellt eine einfache und nicht-invasive Diagnostik dar. Ultraschall sind Wellen, die oberhalb des menschlichen Hörbereichs liegen und eine Frequenz von über 20kHz haben. Ultraschallwellen werden in speziellen Kristallen durch Nutzung des piezoelektronischen Effektes erzeugt. Die so erzeugten longitudinalen Schalldruckwellen – die durch Anlegung eines elektrischen Wechselfeldes am Kristall zu einer mechanischen Verformung des piezoelektronischen Materials führen – verursachen eine Komprimierung oder Expansion des geschallten Gewebes. Zur besseren Steuerung der Schallwellen wird in der bildgebenden Diagnostik ein Schallkopf, der 192 dieser piezoelektronischen Elemente enthält, verwendet. Bei der Untersuchung werden die Ultraschallwellen von den

verschiedenen Gewebearten und den unterschiedlichen akustischen Impedanzen absorbiert oder reflektiert. Der Schallkopf dient dabei als Schallsender und -empfänger. Aufgrund der bestehenden Proportionalität zwischen der Laufzeit des Impulses und der Distanz der reflektierenden Gewebefläche zum Schallkopf kann durch die Umwandlung der reflektierten Schallwellen in elektrische Impulse und ihrer gleichzeitigen Verstärkung auf einem Bildschirm, die Reflexion der Ultraschallwellen sichtbar gemacht werden. Die einfachste Darstellung der reflektierten Wellen ist ein oszilloskopischer Punkt (A-Mode). Wird dieser Punkt über einen zeitlichen Moment dargestellt, können quantitative Aussagen zur Ventrikel- und Vorhofgröße, zu Wanddicken, zur Geschwindigkeit der Wandbewegung und zur Aorta getroffen werden. Dieses Verfahren heißt M-Mode. Im Gegensatz dazu werden in der 2D-Echokardiographie Bewegungsabläufe des Herzens, Größenverhältnisse oder anatomische Auffälligkeiten beurteilt. Dabei wird der Schallkopf mechanisch sektorförmig oder linear bewegt.

2.5.2. Linksherzkatheter

Die Messung der physiologischen Parameter von Druck und Volumen kann durch die spezielle Technik der Konduktanz bestimmt werden. Das bedeutet, dass über die Leitfähigkeit des Blutes das linksventrikuläre Volumen bestimmt wird. Der Konduktanzkatheter besteht aus einem Drucksensor über und unter dem sich paarweise Elektroden befinden, die ein elektrisches Feld im linken Ventrikel erzeugen. Die Potenzialveränderungen innerhalb des Feldes werden kontinuierlich aufgezeichnet.

Aus diesen Daten wird das intraventrikuläre Volumen V_i durch die Formel

$$V_i(t) = (1/\alpha) (pL^2) [G_i(t) - G_{pi}]$$

berechnet, wobei α einen Kalibrierungsfaktor darstellt. Andere Faktoren, die einen Einfluss auf diese Gleichung haben, sind der elektrische Widerstand des Blutes (p), der Abstand zwischen den Elektroden (L), die gesamte Konduktanz im linken Ventrikel und im umliegenden Gewebe (G_i), außerdem die Konduktanz des umgebenden Gewebes, die von

der kompletten Konduktanz subtrahiert wird damit eine wirkliche Messung im linken Ventrikel stattfindet. Aus den Parametern von Druck und linksventrikulärem Volumen ist es möglich, eine in-vivo-Druck-Volumen-Kurve graphisch darzustellen.

2.6. Durchführung der invasiven und nicht-invasiven Diagnostik

2.6.1. Anästhesie

Die Tiere wurden zur echokardiographischen und zur Herzkatheterdiagnostik mit Phenobarbital in der Dosierung 50 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal narkotisiert. Nach einer Wartezeit von zehn Minuten wurde durch Schmerzreizsetzung die Narkosetiefe überprüft.

2.6.2 Ablauf Echokardiographie

Nach erfolgter Narkose wurde die linke Brustseite mit einem elektrischen Standard-Haarschneider rasiert und danach Ultraschall-Gel aufgetragen. Die Untersuchung wurde in Linksseitenlage durchgeführt.

2.6.2.1 M-Mode

Im M-Mode wurde der Schallkopf zur Messung links-parasternal angesetzt, um das Herz in der kurzen Achse in halber Höhe des linken Ventrikels im Bereich des Papillarmuskels zu vermessen. Dabei wurden bestimmt:

- der linksventrikuläre endsystolische Diameter (LVDes)
- der linksventrikuläre enddiastolische Diameter (LVDeD)
- die Wanddicke des interventrikulären Septums, enddiastolisch (IVSed)

- die Dicke der posterioren Wand des linken Ventrikels, enddiastolisch (PW_{ed})

Aus den im M-Mode gemessenen Parametern des enddiastolischen und endsystolischen Diameters des linken Ventrikels konnte die Verkürzungsfraktion des linken Ventrikels (fractional shortening, kurz: FS) mit der Formel

$$\text{FS (\%)} = [(LVD_{ed} - LVD_{es}) / (LVD_{ed}) \times 100]$$

bestimmt werden.

Weiterhin interessierten uns die Herzgewichte, die aus dem im M-Mode gewonnenen Werten nach folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Herzgewicht (g)} = 1,04 \times [(LVD_{ed} + PW_{ed} + IVS_{ed})^3 - LVD_{d}^3] \times 0,8 + 0,14$$

Aus den im M-mode bestimmten Werten wird der Index der linksventrikulären Hypertrophie bestimmt. Dazu werden der Durchmesser der Hinterwand (PW_d) und des Septums (IVS_d) addiert und durch den enddiastolischen Durchmesser (LVD_d) dividiert:

$$\text{LVH - Index} = [(IVS_{d} + PW_{d}) / LVD_{d}]$$

2.6.2.2. 2D-Mode

Für die 2D-Echokardiographie wurde das Herz in der langen Achse geschallt. Der Schallkopf wurde dabei linksseitig parasternal angesetzt und es wurden gemessen:

- die Fläche des linken Ventrikels enddiastolisch, lange Achse (AIV_{ed}, long axis)
- die Fläche des linken Ventrikels endsystolisch, lange Achse (AIV_{es}, long axis)

Aus den im 2D-Mode gemessenen Parametern der größten enddiastolischen- und größten endsystolischen Fläche des linken Ventrikels konnte die Auswurfraction des Herzens EF mit der Formel

$$\text{EF (\%)} = [(AIVed - AIVes) / AIVed \times 100]$$

bestimmt werden.

Weiterhin kann das linksventrikuläre enddiastolische Volumen (LVEDV) durch das Halbellipsoid-Modell berechnet werden. Dabei wird bei dem zu bestimmenden Herzzyklus die Fläche der kurzen Achse (Am) parasternal auf Höhe des Papillarmuskels gemessen, und die Fläche der langen Achse von der Herzspitze ausgehend bis zur Mitralklappe im 2- oder 4-Kammerblick geschallt. Zur Berechnung des linksventrikulären Volumens wird das fünffache Produkt von Querschnittsfläche im Kurzabschnitt und Fläche der Ventrikellänge bestimmt und durch die Zahl 6 geteilt [137]:

$$\text{LVEDV} = 5/6 \times \text{Querschnittsfläche im Kurzachsenschnitt(Diastole)} \times \text{Ventrikellänge (Diastole)}$$

Nach Abschluss der Untersuchung wurden die Tiere gesäubert und der Verlauf der Aufwachphase dokumentiert. Die Messungen wurden digital mitgeschnitten.

2.6.3 Intubation und Ventilation

Die Tiere wurden in Rückenlage fixiert. Um die Epiglottis zu öffnen, wurden der Kopf der Tiere rekliniert. Unter Sicht erfolgte die Einführung eines Plastikröhrchens (Braunüle, grün) bis zur trachealen Bifurkation. Nach zuvoriger Überprüfung seitengleicher Thoraxbewegung wurden die Tiere über ein Beatmungsgerät mit einem Hub von 1ml/kg KG Raumluft und einer Beatmungsfrequenz von 200 Atemzüge/min ventiliert.

2.6.4 Durchführung der Herzkatheteruntersuchung

Der Halsbereich der Tiere wurde mit Wasser besprüht um Behinderungen durch Haare zu vermeiden. Die Hautinszision am ventralen Halsbereich erfolgte mittig von cranial nach kaudal. Dabei wurden die Halsmuskulatur und die Speicheldrüsen vorsichtig durchtrennt um mögliche Blutungen zu vermeiden. Verletzte Gefäße wurden koaguliert. Danach wurde die rechte *A. carotica communis* freipräpariert. Hieran anschließend wurde eine proximale und distale Blutsperrensetzung durchgeführt. Mit spezieller Katheterpinzette konnte der Mikro-Konduktanz-Katheter in die *A. Carotis communis* eingeführt und unter ständiger Kontrolle der Hämodynamikparameter und Druck-Volumen-Kurve optimal vor der Aortenklappe platziert und anschließend retrograd in den Ventrikel geschoben werden.

2.6.4.1 Kalibrierung des Herzkatheters

Es wurde die *V. jugularis* punktiert und ein intravenöser Zugang gelegt, über den mit einer Heparinspritze 0,5ml einer 10% NaCl-Lösung infundiert wurden. Dies ist notwendig um die Parallelkonduktanz des umliegenden Gewebes bestimmen zu können. Der Katheter misst die Gesamtkonduktanz, von der die Parallelkonduktanz abgezogen wird, damit die reale Konduktanz des Blutvolumens bestimmt werden kann. Durch den Einstrom der hypertonen Kochsalzlösung nimmt das Konduktanzsignal rapide bei sonst konstantem Blutvolumen zu. Dieser rasche Anstieg zeigt, dass durch die Konduktanz die Osmolarität im gesamten linken Ventrikel gemessen wird, aus der das Blutvolumen errechnet werden kann.

2.6.5 Hämodynamische Messung durch Konduktanzkatheter

2.6.5.1 Vorlast-abhängige Parameter

Zur Aufzeichnung der basalen Hämodynamik wurde der Konduktanzkatheter optimal im linken Ventrikel platziert. Unter kurzer Apnoe wurden die Druck-Volumen-Kurven aufgezeichnet, die Anzahl der dabei stattgefundenen Herzschläge analysiert und als Mittelwert aller Schläge ausgewertet.

2.6.5.2 Vorlast-unabhängige Parameter

Zur Bestimmung dieser Parameter wurden die Druck-Volumen-Kurven im linken Ventrikel bei gleichzeitiger Senkung der Vorlast gemessen. Diese Vorlastsenkung erfolgte mit Hilfe der *V. cava inferior*-Okklusion. Dabei wurde nach Eröffnen des Peritoneums und gezieltem Aufsuchen der *V. cava inferior* diese mit einer Pinzette für drei Sekunden abgeklemmt. Die Folge ist ein Druckabfall mit folgendem Volumenmangel im linken Ventrikel. Eine Linkswanderung und Verkleinerung der Druck-Volumen-Kurve zeigt dies auch graphisch.

2.6.5.3 Systolische Parameter

Als systolische Parameter wurden bestimmt:

- **Herzfrequenz** (HF b/min): Die Herzfrequenz ist die Anzahl der Schläge pro Minute und wird in min^{-1} oder in beats per minute (b/min) angegeben.
- **Maximaler linksventrikulärer Druck** (LVP max. mmHg): Der maximale linksventrikuläre Druck ist der höchste Druck im linken Ventrikel und wird in mmHg angegeben.
- **Linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit** (dP/dt_{max} mmHg/s): Die linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit ist die maximale Geschwindigkeit

der Druckzunahme während der systolischen Anspannungsphase. dP/dt_{max} ist ein Maß für die Herzkraft (Inotropie) und wird in mmHg/s angegeben.

- **Schlagvolumen** (SV ml): Das Schlagvolumen ist die Menge an Blutvolumen, das während der Systole aus dem linken Ventrikel in die Aorta gepumpt wird. Durch Abziehen des endsystolischen Volumens vom enddiastolischen Volumen kann das Schlagvolumen berechnet werden. Die Einheit wird in ml angegeben.
- **Ejektionsfraktion** (EF %): Die Ejektionsfraktion ist die maximale Fraktion, die vom enddiastolischen Volumen ausgeworfen wird. Die EF wird in Prozent angegeben. Die Ejektionsfraktion ist geeignet zur Beurteilung der systolischen Funktion.

2.6.5.4 Diastolische Parameter

Als diastolische Parameter wurden bestimmt:

- **linksventrikulärer enddiastolischer Druck** (LVEDP mmHg): Der linksventrikuläre enddiastolische Druck ist der maximale Druck, der am Ende der Diastole kurz vor Beginn der Systole im linken Ventrikel gemessen werden kann. Er ist einer der wichtigsten Parameter zur Beurteilung der diastolischen Funktion und wird in mmHg angegeben.
- **Linksventrikuläre Druckabfallgeschwindigkeit** (dP/dt_{min} mmHg/min): Die linksventrikuläre minimale Druckabfallgeschwindigkeit ist ein Parameter der frühen diastolischen Relaxation des Ventrikels. Zur Bestimmung wird die 1. Ableitung der Druckkurve verwendet. Die Einheit ist mmHg.
- **Enddiastolisches Volumen** (EDV ml): Das enddiastolische Volumen ist das Volumen, das in der Diastole kurz vor der Austreibungsphase im linken Ventrikel vorhanden ist. Die Einheit ist ml.
- **Tau** (ms): Tau ist die Zeit von Beginn der minimalen Druckabfallgeschwindigkeit bis kurz vor Ende der Relaxation, d.h. bis der Druck auf 10 % des maximalen LVP gefallen ist. Tau ist ein Maß für die frühe Diastole.

- **Enddiastolische Druck-Volumen-Beziehung (EDPVR):** Die enddiastolische Druck-Volumen-Beziehung ist ein Vorlast-unabhängiger Wert. Der Parameter wird während der *V. cava*-Okklusion mit bedingter Vorlastsenkung gemessen. Er ist ein Maß für die Steifigkeit bei Dehnung des linken Ventrikels in der Diastole. Dieser Parameter wird durch Berechnung des Anstieges einer linearen oder exponentiellen Funktion, die alle gemeinsamen Punkte der enddiastolischen Druck-Volumen-Kurven berührt, bestimmt.

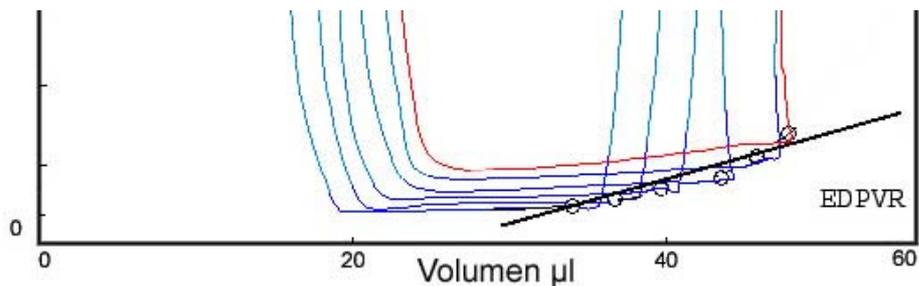


Abb.7: EDPVR lineare Annäherung

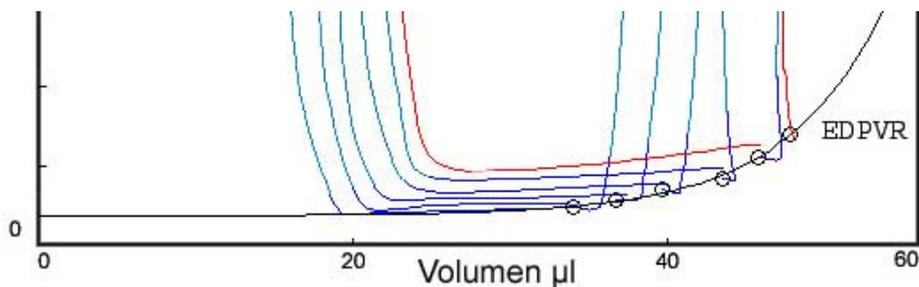


Abb. 8: EDPVR exponentielle Annäherung

2.7. Organentnahme

Zur Serumgewinnung wurde Blut entnommen, zentrifugiert und das Serum abpipetiert und bei -80°C eingefroren. Die Tiere wurden mit Kalium-Chlorid getötet. Anschließend wurden das Herz, die Leber und die Niere entnommen, gewogen und präpariert. Die Aorta ascendens wurde kurz oberhalb der Aortenklappe vom Herz getrennt. In Eppendorf-Tubes wurden die gewonnenen Präparate in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für die histologischen Untersuchungen haben wir Querschnitte von dem Herz, der Aorta und der

Niere angefertigt und mit Tissue-Tek luftdicht eingeschlossen. Anschliessend wurden die histologischen Schnitte in flüssigem Stickstoff fixiert. Die endgültige Lagerung bis zur weiteren Aufarbeitung erfolgte bei -80 °C.

2.8. Picro-Sirius-Rot-Färbung

Kollagen spielt eine entscheidende Rolle in der strukturellen Organisation des gesunden und auch des erkrankten Herzmuskels. Studien von Whittaker zeigen, dass die PSR-Färbung ein sehr klares histologisches Bild des Kollagen-Bindegewebes liefert und die kombinierte Auswertung mit zirkulär polarisiertem Licht eine sehr genaue quantitative Beurteilung ermöglicht [138,139]. Als Reagenzien wurden gesättigte Pikrinsäure und Sirius-Rot 1% (1g Sirius-Rot auf 100ml Aqua destillata) verwendet. Der Ansatz bestand aus 90ml Pikrinsäure und 10ml Sirius-Rot-Lösung und wurde mindestens 24 Stunden vor Gebrauch hergestellt. Die Präparate wurden zirka 30 Minuten gefärbt und danach kurz in Aqua destillata gespült. Das Entfärben erfolgte über eine aufsteigende Alkoholreihe mit 50%, 75% und 95% Ethanol über je 1-2 Minuten. Daraufhin bedurfte es eines fünfminütigen Bads in Xylol und Alkohol abs. (1:1) und der Überführung in Xylol I, II und III für je fünf Minuten. Nach der Trocknung des Präparates erfolgte der Verschluss mit Entella.

2.9. Statistische Auswertung

Für die Auswertung der gewonnenen Ergebnisse wurde das Computerprogramm *SSPSS 11.0 – Statistical Package for the Social Science* – genutzt. Für die Auswertung der Signifikanz der Testergebnisse wurde eine Fehlerwahrscheinlichkeit $p < 0,05$ als signifikantes Ergebnis gewertet. Bei nicht-signifikanten Ergebnissen waren die p-Werte also größer 0,05. Mit Hilfe der ANOVA (Analysis of Variance) wurden die Unterschiede zwischen den verschiedenen Tiergruppen bestimmt. Für die Nutzung von ANOVA müssen folgende Kriterien erfüllt sein:

- Normalverteilung der Fehlerkomponenten
- Homogenität der Fehlervarianzen
- Unabhängigkeit der Fehlerkomponenten

Durch den Nachweis signifikanter Unterschiede zwischen den Tiergruppen mit der ANOVA Methode wurde folgend der Post-HOC-Test der Tamhane's T2 Test angewandt um mögliche auftretenden Varianzen verursacht durch die gemessenen Variablen, zu berechnen. Denn die ANOVA-Methode ist an folgende Bedingungen geknüpft. Die Fehlerkomponenten müssen normalverteilt und unabhängig sein und Fehlervarianzen eine homogene Einheit bilden. Zur Untersuchung eventueller Unterschiede in der Mortalität der Tiergruppen wurde, aufgrund der geringen Anzahl an Tieren in einer Gruppe der Chi-Quadrat Test nach Fischer's Exact Test verwendet.

3. Ergebnis

In diesem Kapitel werden die gemessenen Ergebnisse der durchgeführten Studie dargestellt. Die Daten sind anhand der beschriebenen statistischen Testverfahren abgesichert. Es werden die gewonnenen Daten der Echokardiographie und die Werte der systolischen und diastolischen Hämodynamik besprochen. In den aufgeführten Tabellen werden Mittelwert und S.E.M. der einzelnen Gruppen dargestellt. Durch Markierung mit Stern (*) und Raute (#) werden die Signifikanzen zwischen den Gruppen dargestellt.

- **KON**
- **KONeNOS**
- **HFNEF**
- **HFNEFeNOS**

3.1. Echokardiographie

3.1.1. Auswurffraktion EF

Gruppen	KON	KONeNOS	HFNEF	HFNEFeNOS
8. Woche				
EF (%) 8. Woche	61,5 ± 3,5	62,8 ± 5,8	56,9 ± 4,9	54,3 ± 5,4

Tabelle 1: linksventrikuläre Auswurffraktion (EF in %)

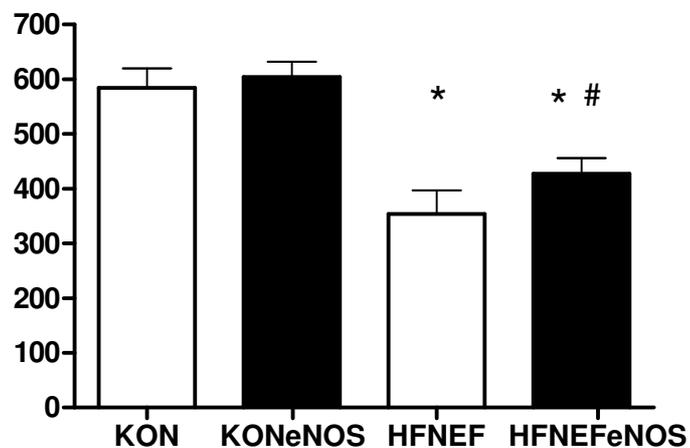
Die Ejektionsfraktion ist der prozentuale Anteil, der vom enddiastolischen Volumen in der Systole ausgeworfen wird. Bei allen Gruppen war über den Studienzeitraum eine LVEF über 50% messbar. Es konnte keine Signifikanz zwischen den Gruppen festgestellt werden. Damit entsprechen die Gruppen HFNEF und HFNEFeNOS einem Kriterium nach den Leitlinien für die diastolische Herzinsuffizienz.

3.1.2. Enddiastolisches Volumen EDV

Gruppen	KON	KONeNOS	HFNEF	HFNEFeNOS
EDV (µl) 8.Woche	584 ± 36	604 ± 28	354 ± 43 *	427 ± 29 *#

Tabelle 2: enddiastolisches Volumen (EDV in µl)

* = $p < 0,05$ HFNEF, HFNEFeNOS vs. KON, # = $p < 0,05$ HFNEF vs HFNEFeNOS



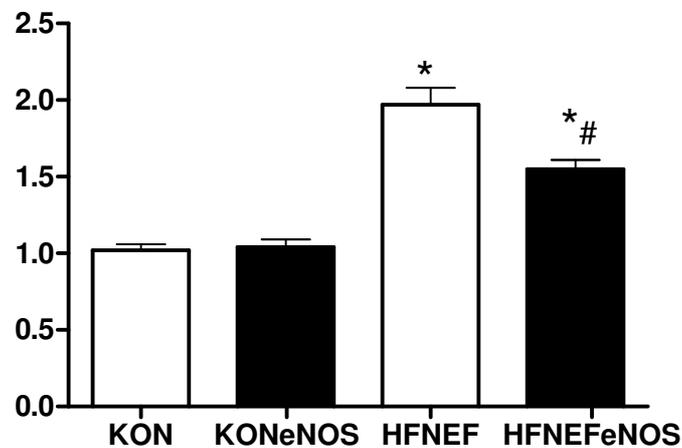
Das enddiastolische Volumen wird in der Diastole kurz vor der Austreibungsphase im linken Ventrikel gemessen. Die in der Echokardiographie gewonnenen Daten zeigen eine signifikante Reduzierung des EDV bei den Gruppen HFNEF und HFNEFeNOS gegenüber den Kontrolltieren KON und KONeNOS. Bei den mit S803 behandelten HFNEFeNOS-Tieren zeigten die Messungen ein signifikant erhöhtes EDV gegenüber den unbehandelten HFNEF-Tieren.

3.1.3. Linksventrikulärer Hypertrophieindex LVH Index

Gruppen	KON	KONeNOS	HFNEF	HFNEFeNOS
LVH-Index 8. Woche	1,02 ± 0,04	1,04 ± 0,05	1,97 ± 0,11 *	1,55 ± 0,06 *#

Tabelle 3: linksventrikulärer Hypertrophie Index (LVH-Index)

* = $p < 0,05$ HFNEF, HFNEFeNOS vs. KON, # = $p < 0,05$ HFNEF vs HFNEFeNOS



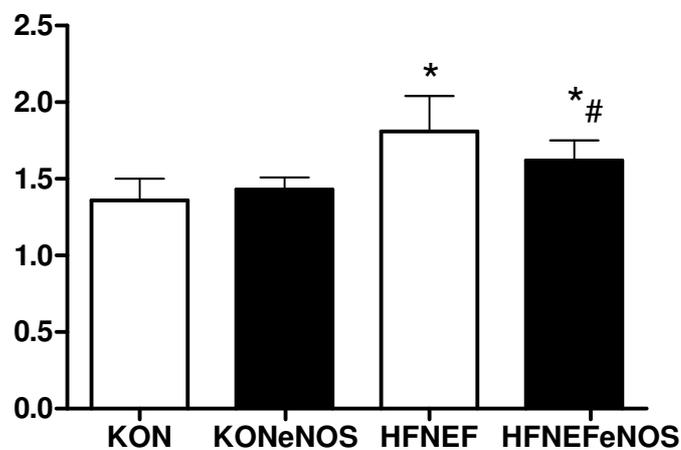
Der LVH-Index wird durch die Summation der Werte des Septums und der Hinterwand und anschließender Division durch den enddiastolischen Durchmesser bestimmt. In den Auswertungen zeigen die hypertensiven Tiere HFNEF und HFNEFeNOS eine signifikante Zunahme des Indexwertes gegenüber den Kontrolltieren KON und KONeNOS. Bei der Gruppe HFNEFeNOS, die das Medikament S803 appliziert bekamen, wurde eine signifikante Reduktion des LVH-Indexes gegenüber der HFNEF-Gruppe berechnet.

3.1.4. Herzgewicht HW

Gruppen	KON	KONeNOS	HFNEF	HFNEFeNOS
HW (mg) 8. Woche	1,36 ± 0,14	1,43 ± 0,08	1,81 ± 0,23 *	1,62 ± 0,13 * #

Tabelle 4: Herzgewicht (HW in mg)

* = $p < 0,05$ HFNEF, HFNEFeNOS vs. KON, # = $p < 0,05$ HFNEFeNOS vs. HFNEF



Die Tiergruppen mit spezieller Salzdiät HFNEF und HFNEFeNOS zeigten eine signifikante Zunahme des Herzgewichts gegenüber den Kontrolltieren KON und KONeNOS am Ende der 8. Woche. Die Behandlung mit dem Studienmedikament S803 führte bei den Tieren HFNEFeNOS zu einer signifikanten Reduktion des Herzgewichts gegenüber den unbehandelten Tieren HFNEF.

3.2. Konduktanzkatheter

3.2.1. Systolische Parameter

3.2.1.1. Herzfrequenz HF

Gruppen	KON	KONeNOS	HFNEF	HFNEFeNOS
HF (S/min)	405 ± 17	402 ± 35	423 ± 19	427 ± 12

Tabelle 5: Herzfrequenz (HF in Schläge/min)

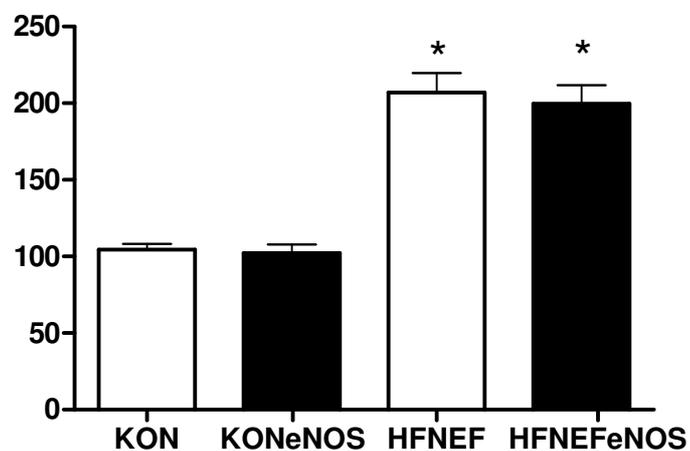
Die Herzfrequenz ist die Anzahl der Herzschläge pro Minute. Es konnte keine Signifikanz zwischen den Gruppen festgestellt werden.

3.2.1.2 Linksventrikulärer endsystolischer Druck LVESP

Gruppen	KON	KONeNOS	HFNEF	HFNEFeNOS
LVESP (mmHg)	104,5 ± 3,8	102,1 ± 5,7	207 ± 12,7 *	199,6 ± 12,2 *

Tabelle 6: Linksventrikulärer endsystolischer Druck (LVESP in mmHG)

* = p < 0,05 HFNEF, HFNEFeNOS vs. KON



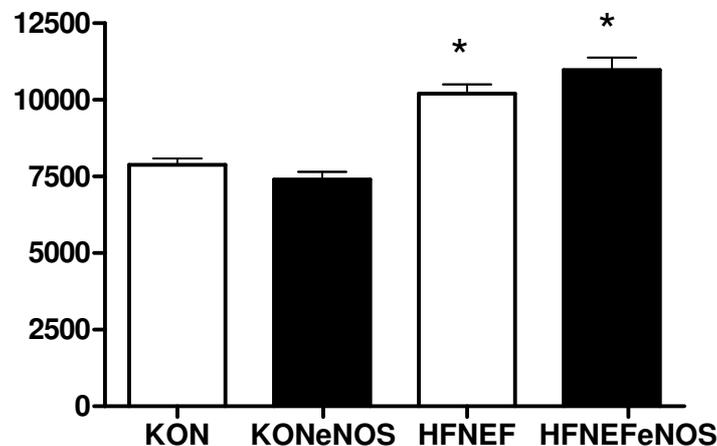
Der LVESP ist am Ende der Systole kurz vor Beginn der Diastole im linken Ventrikel zu messen. Die Tiere mit Salznahrung HFNEF und HFNEFeNOS zeigten einen signifikanten Anstieg des LVESP gegenüber den Kontrolltieren KON und KONEsNOS. Dabei war keine Beeinflussung des arteriellen Hypertonus durch S803 erkennbar. Es gibt keine Signifikanz zwischen den Gruppen HFNEF und HFNEFeNOS. Der LVESP bei den HFNEF- und HFNEFeNOS-Tieren bestätigt, dass die Tiere einen arteriellen Hypertonus entwickelten.

3.2.1.3. Kontraktionsgeschwindigkeit dP/dt max.

Gruppen	KON	KONEsNOS	HFNEF	HFNEFeNOS
dP/dtmax. (mmHg/s)	7876 ± 209	7399 ± 247	10203 ± 304 *	10976 ± 405 *

Tabelle 7: Kontraktionsgeschwindigkeit (dP/dt max. in mmHG/s)

* = p < 0,05 HFNEF, HFNEFeNOS vs. KON



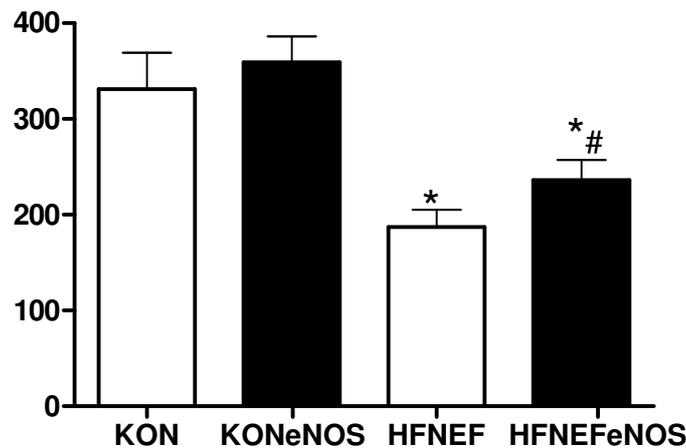
Die dP/dt max. ist ein Maß für die Herzkraft (Inotropie) und beschreibt den Druckanstieg in der systolischen Anspannungsphase. Die Gruppen mit einer Salzkost HFNEF und HFNEFeNOS zeigten einen signifikanten Anstieg von dP/dt max gegenüber den Kontrolltieren KON und KONEsNOS. Zwischen den Gruppen HFNEF und HFNEFeNOS besteht keine Signifikanz.

3.2.1.4. Schlagvolumen SV

Gruppen	KON	KONeNOS	HFNEF	HFNEFeNOS
SV (μ l)	331 ± 38	359 ± 27	187 ± 18 *	236 ± 21 *#

Tabelle 8: Schlagvolumen (SV in μ l)

* = $p < 0,05$ HFNEF, HFNEFeNOS vs. KON, # = $p < 0,05$ HFNEFeNOS vs. HFNEF



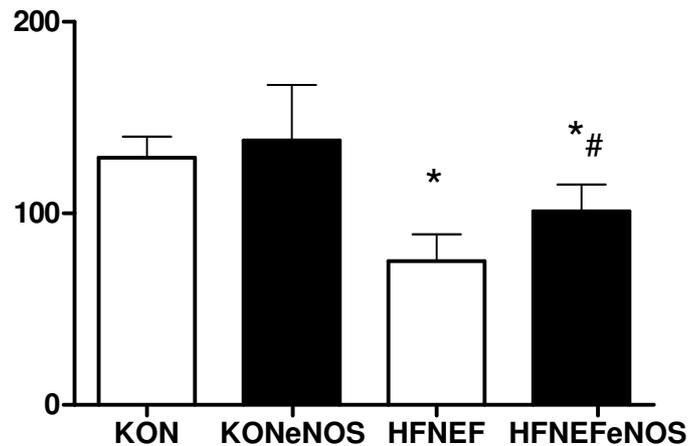
Das Schlagvolumen ist die Menge an Blutvolumen, das während der Auswurfphase aus dem linken Ventrikel in die Aorta gepumpt wird. Die bei den Tiergruppen HFNEF und HFNEFeNOS gemessenen Parameter zeigen eine signifikante Reduktion des SV gegenüber den Kontrolltieren KON und KONeNOS. Zusätzlich ist das Schlagvolumen bei der Gruppe HFNEFeNOS gegenüber der unbehandelten Gruppe HFNEF signifikant erhöht.

3.2.1.5. Herzminutenvolumen HMV

Gruppen	KON	KONeNOS	HFNEF	HFNEFeNOS
HMV (ml/min)	129 ± 11	138 ± 29	75 ± 14 *	101 ± 14 *#

Tabelle 9: Herzminutenvolumen (HMV in ml/min)

* = $p < 0,05$ HFNEF, HFNEFeNOS vs. KON, # = $p < 0,05$ HFNEFeNOS vs. HFNEF



Das Herzminutenvolumen gibt die Menge an Blutvolumen an, die in einer Minute aus dem linken Ventrikel ausgeworfen wird. Das HMV wird aus dem Produkt von Herzfrequenz und Schlagvolumen berechnet. In den Auswertungen zeigte sich eine signifikante Reduktion des HMV bei den HFNEF- und HFNEFeNOS-Tieren gegenüber den Kontrolltieren KON und KONeNOS. Die Behandlung mit dem eNOS-enhancer S803 führte bei der Gruppe HFNEFeNOS zu einer signifikanten Erhöhung des HMV gegenüber der Gruppe HFNEF.

3.2.1.6. Endsystolisches Volumen ESV

Gruppen	KON	KONeNOS	HFNEF	HFNEFeNOS
ESV (µl)	253 ± 18	217 ± 36	165 ± 32	201 ± 15

Tabelle 10: Endsystolisches Volumen (EDV in µl)

Das endsystolische Volumen ist das Volumen, das am Ende der Systole vor Beginn der Diastole im linken Ventrikel vorhanden ist. Es konnte keine Signifikanz zwischen den Gruppen festgestellt werden.

3.2.2. Diastolische Parameter

3.2.2.1 Minimale Druckabfallgeschwindigkeit dP/dt min.

Gruppen	KON	KONeNOS	HFNEF	HFNEFeNOS
dP/dt min (mmHg/s)	7263 ± 186	7199 ± 199	6793 ± 288	8679 ± 398

Tabelle 11: Minimale Druckabfallgeschwindigkeit (dP/dt min. in mmHG/s)

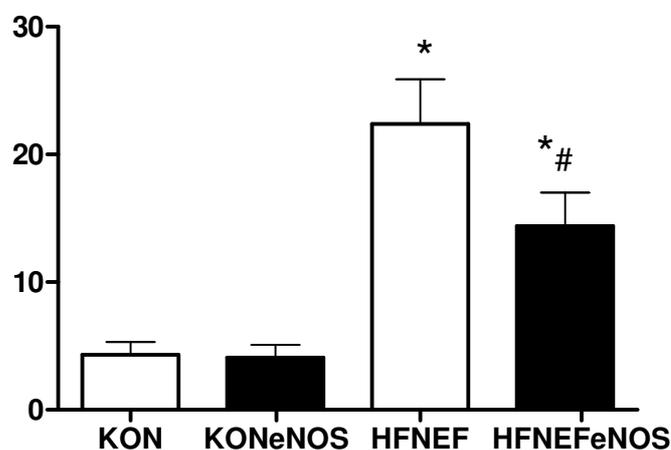
Die minimale Druckabfallgeschwindigkeit ist ein Wert für die Relaxation des Herzens bei beginnendem Druckabfall. Es konnte keine Signifikanz zwischen den Gruppen festgestellt werden.

3.2.2.2. Linksventrikulärer enddiastolischer Druck LVEDP

Gruppen	KON	KONeNOS	HFNEF	HFNEFeNOS
LVEDP (mmHg)	4,3 ± 1	4,1 ± 1	22,4 ± 3,5 *	14,4 ± 2,6 *#

Tabelle 12: Linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP in mmHG)

* = p < 0,05 HFNEF, HFNEFeNOS vs. KON, # = p < 0,05 HFNEFeNOS vs. HFNEF



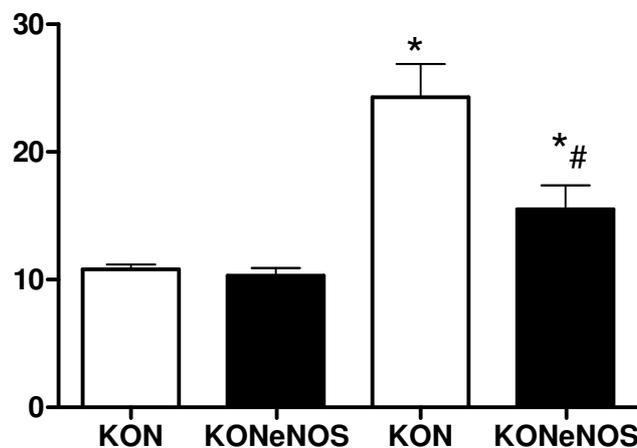
Als linksventrikulären enddiastolischen Druck, kurz LVEDP, bezeichnet man den Druck im linken Ventrikel, der am Ende der Diastole herrscht. Die Tiere mit einer speziellen Salzdiät HFNEF und HFNEFeNOS zeigten einen signifikanten Anstieg des LVEDP gegenüber den Kontrolltieren KON und KONeNOS. Die Tiergruppe HFNEFeNOS, die mit S803 behandelt worden waren, zeigten eine signifikante Reduktion des LVEDP gegenüber der HFNEF-Gruppe.

3.2.2.3. Frühe Relaxationszeit Tau

Gruppen	KON	KONeNOS	HFNEF	HFNEFeNOS
Tau (ms)	10,8 ± 0,4	10,3 ± 0,6	24,3 ± 2,6 *	15,5 ± 1,9 *#

Tabelle 13: Frühe Relaxationszeit (Tau in ms)

* = $p < 0,05$ HFNEF, HFNEFeNOS vs. KON, # = $p < 0,05$ HFNEFeNOS vs. HFNEF



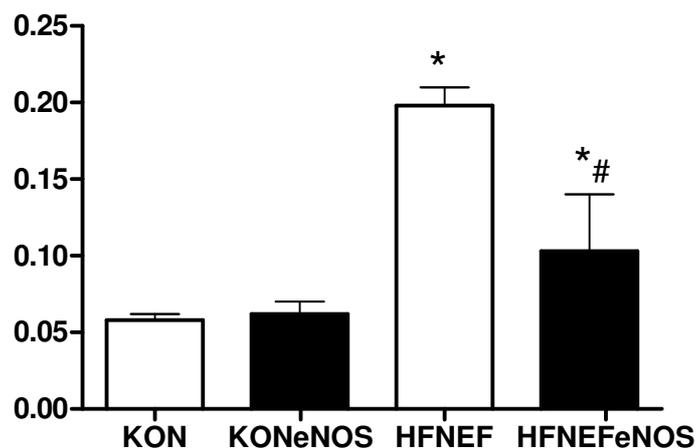
Tau stellt einen wichtigen Parameter zur Beurteilung der diastolischen Funktion dar. Es gibt die Zeit zwischen Beginn der minimalen Druckabfallgeschwindigkeit bis kurz vor Ende der Diastole an. Dabei zeigen die Ergebnisse eine signifikante Erhöhung bei den Gruppen HFNEF und HFNEFeNOS gegenüber den Kontrolltieren KON und KONeNOS. Die Behandlung mit S803 bei den HFNEFeNOS-Tieren führte zu einer signifikanten Reduktion von Tau in der HFNEF-Gruppe.

3.2.2.4. Enddiastolische-Druck-Volumen-Beziehung EDPVR

Gruppen	KON	KONeNOS	HFNEF	HFNEFeNOS
EDPVR	0,058 ± 0,004	0,062 ± 0,008	0,198 ± 0,012 *	0,103 ± 0,037 *#

Tabelle 14: Enddiastolische Druck-Volumen-Beziehung (EDPVR)

* = $p < 0,05$ HFNEF, HFNEFeNOS vs. KON, # = $p < 0,05$ HFNEFeNOS vs. HFNEF



Die Steifheit des linken Ventrikels wird über die 1. Ableitung der enddiastolischen Druck-Volumen-Beziehung (EDPVR) berechnet. Die EDPVR ist ein Vorlast-unabhängiger Parameter. Durch die EDPVR kann die intrinsische Steifigkeit des linken Ventrikel gemessen werden. Bei der Auswertung war eine signifikante Zunahme des EDPVR des Myokards bei den salzbehandelten Tieren HFNEF und HFNEFeNOS gegenüber den Kontrolltieren KON und KONeNOS feststellbar. Die Gruppe HFNEF zeigte eine signifikante Zunahme des EDPVR des linken Ventrikels gegenüber der mit S803 behandelten Gruppe HFNEFeNOS.

3.3. Kardiale Fibrose

Gruppen	KON	KONeNOS	HFNEF	HFNEFeNOS
Area Fraction	1,16 ± 0,47	1,46 ± 0,65	3,46 ± 1,47 *	1,33 ± 0,41 *#

Tabelle 15: Kardiale Fibrose

* = $p < 0,05$ HFNEF, HFNEFeNOS vs. Kon, # = $p < 0,05$ HFNEFeNOS vs. HFNEF

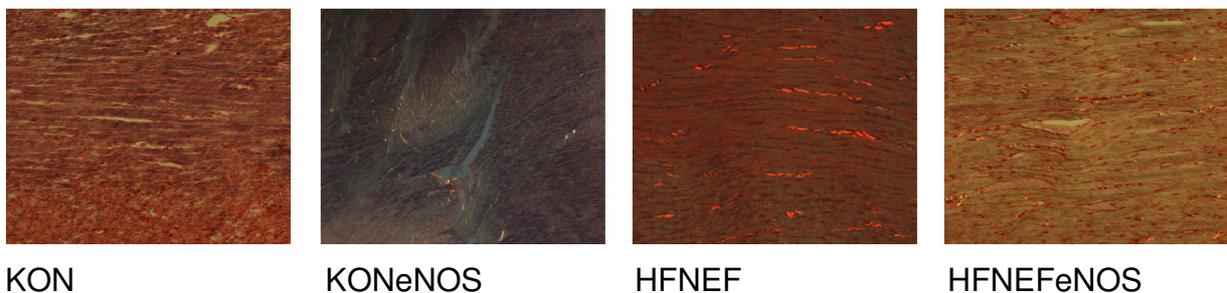
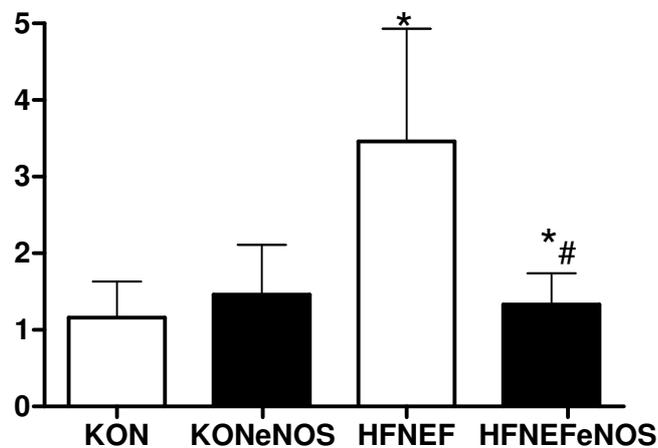


Abb.: histologischer Gewebsschnitt linker Ventrikel, mikroskopische Darstellung mit bipolaren Licht und nach PSR-Färbung (Kollagen schimmert rötlich)

Bei den Gruppe HFNEF und HFNEFeNOS zeigte sich in der PSR-Färbung eine signifikante Zunahme der kardialen Fibrose gegenüber den Kontrollgruppen KON und KONeNOS. Die Behandlung von HFNEFeNOS mit S803 führte zu einer signifikanten Reduktion der kardialen Fibrose gegenüber den HFNEF-Tieren.

3.4. Zusammenfassung

Die gemessenen Parameter LVP, dP/dt max., HMV, SV zeigten bei den Gruppen HFNEF und HFNEFeNOS einen signifikanten Unterschied gegenüber den Kontrolltieren KON und KONeNOS, wobei – gegenüber KON und KONeNOS – LVP und dP/dt max. erhöht und HMV und SV vermindert waren. Die mit S803 behandelten Tiere HFNEFeNOS zeigten in diesen gewonnenen Daten signifikante Unterschiede zu der HFNEF-Gruppe. Das HMV als auch das SV waren bei den HFNEFeNOS-Tieren signifikant gegenüber den HFNEF-Tieren erhöht. Für die diastolische Funktion sind bei LVEDP, Tau, EDPVR und EDV signifikante Unterschiede in den HFNEF- und HFNEFeNOS-Gruppen gegenüber den Kontrolltieren feststellbar. S803 führt zu einer signifikanten Verbesserung der diastolischen Funktion bei den HFNEFeNOS-Tieren gegenüber den HFNEF-Tieren. In der PSR-Färbung zeigte sich eine signifikante Zunahme der kardialen Fibrose bei den HFNEF- und HFNEFeNOS-Tieren gegenüber den Kontrolltieren. Die Behandlung der HFNEFeNOS-Gruppe führte zu einer signifikanten Reduktion der kardialen Fibrose gegenüber der unbehandelten HFNEF-Gruppe.

4. Diskussion

4.1. Material und Methodik

4.1.1. Tiermodell

Die Dahl-Salz-sensitiven Ratten wurden von L. Dahl aus normotensiven Sprague-Dawley Ratten gezüchtet. Aufgrund genetischer Disposition entwickeln die Tiere unter spezieller Salzdiät einen arteriellen Hypertonus. Es konnte gezeigt werden, dass die Tiere als Folgeerscheinung eine Herzinsuffizienz mit Myokardhypertrophie, Lungenstauung und erhöhtem Serum-Noradrenalin-Spiegel entwickeln. Als Ursache für die Entwicklung eines arteriellen Hypertonus wird einerseits eine Veränderung von ANP diskutiert, was eine verminderten Volumenelemination über die Niere bedingt [133]. Weitere Ursache werden in der Response der renalen und extrarenalen Gefäßmuskulatur auf verschiedene hormonelle Vasokonstriktoren und -dilatatoren wie ANP, Angiotensin-2, NO und Endothelin-1 vermutet [134]. Ein weiterer Einfluss auf die Entwicklung eines arteriellen Hypertonus wird im erhöhten Sympathikotonus mit erhöhtem Noradrenalin-Spiegel und erhöhten Plasmaspiegel an Vasopressin mit dadurch bedingtem erhöhtem peripherem Gefäßwiderstand gesehen [135]. Rapp und seine Arbeitsgruppe vermuten als Ursache eines arteriellen Hypertonus eine mögliche Chlorid-Rückresorption an der Henle-Schleife der Nieren, was zu einer Volumenretention von Wasser führt und möglicherweise verantwortlich für den Bluthochdruck der Tiere ist. Im Gegensatz zu anderen Tiermodellen, bei denen z. B. durch ein gesteigertes Renin-Angiotensin-Aldosteron-System ein arterieller Hypertonus entsteht, entwickelt sich bei den Dahl-Salz-sensitiven Ratten ein arterieller Hypertonus aufgrund externer Einflüsse. Der externe Einfluss wird durch die Salzdiät mit 8% NaCl-Gehalt getriggert [136]. Das hypertensive Dahl-Salz-sensitive Rattenmodell gilt als Standard in der Hypertonieforschung. So konnte in vielen Studien die Auswirkung des arteriellen Hypertonus auf das Herz-Kreislaufsystem als auch Folgen des arteriellen Hypertonus mit hypertensive Endorganschäden untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass sich bei den hypertensiven Dahl-Ratten eine reaktive Myokardhypertrophie ausbildet, und die Tiere primär hämodynamisch messbare diastolische Funktionsstörung mit verminderter LV-Dehnbarkeit und LV-Steifheit zeigen [126]. Die hypertensiven Dahl-Ratten entwickeln im weiteren Krankheitsverlauf

systolische Funktionsstörungen mit eingeschränkter LV-Funktion [127]. In vielen Arbeiten zur Untersuchung einer diastolischen Dysfunktion bildet das Dahl-Salz-sensitiven Rattenmodell die Grundlage. So konnte durch dieses Modell das Wissen und Verständnis für die Pathologie einer diastolischen Herzinsuffizienz erweitert werden, und Ursachen für zunehmende LV-Steifheit als auch verminderte LV-Dehnbarkeit in den Kardiomyozyten selbst so wie in einer neurohumoralen Systemaktivierung als auch in der extrazellulären Matrix gefunden werden. Durch dieses zunehmende Verständnis für die Pathologie einer diastolischen Dysfunktion konnten gezielt in diesem Tiermodell mögliche Therapiestrategien überprüft werden. Besonders ACE-Hemmer, AT-1 Antagonisten und Aldosteronantagonisten, Medikamente, die in der Behandlung der systolischen Herzinsuffizienz etabliert sind, konnten erfolgreich getestet werden [37]. Da die Pathologie einer diastolischen Dysfunktion eine konzentrischen Myokardhypertrophie und eine zunehmenden kardialen Fibrose beinhaltet, konnten diese Medikamente mit antihypertrophen und antifibrotischen Effekten positive Ergebnisse zeigen. Ebenfalls kam es in diesen Studien zu einer gleichzeitigen effektiven Blutdrucksenkung. Es existiert aber bisher keine Arbeit, die den Einfluss eines eNOS-enhancers auf die diastolische Dysfunktion im hypertensiven Dahl-Salz-sensitiven Rattenmodell untersucht. Die Pathologie einer diastolischen Dysfunktion ist bis heute noch nicht vollständig geklärt. Weitere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass Dahl-Salz sensitive Tiere, die einen Diabetes mellitus über Streptozin induziert bekamen, eine raschere Progression und Manifestierung einer diastolischen Funktionsstörung entwickeln. Somit wird es in Zukunft sicher weitere Arbeiten geben, die dieses Tiermodell als Grundlage nehmen, um das Verständnis einer diastolischen Dysfunktion neben der Pathophysiologie auch in Form von molekularbiologischen Untersuchungen zu erweitern. Allgemein bieten pathophysiologische Tiermodelle die Möglichkeit, menschliche Erkrankungen nachzuahmen, Ursachen zu eruieren, Therapiestrategien zu überprüfen und neue pharmakologische Interventionsmöglichkeiten zu testen. Ein Problem stellt die Übertragung der gewonnenen Ergebnisse der Tierstudien in die humane Herz-Kreislaufphysiologie dar. Spezies die dem menschlichen Herzkreislaufsystem eher gleichen, wie etwa Schweine- oder Hundetiermodelle, stehen aber nicht zu diesen Kosten und nicht transgen verändert zu Verfügung, so dass diese Einschränkung angenommen werden muss.

4.1.2. Hämodynamik

Seit den 80er Jahren können durch Konduktanzmessungen mit Linksherzkatheter Druck-Volumen-Kurven beim Menschen aufgezeichnet werden. Aufgrund des hohen Kostenfaktors und der zeitaufwendigen Interpretation gehört die Untersuchung durch einen Herzkatheter beim Krankheitsbild der Herzinsuffizienz nicht zur Routineuntersuchung und wird nur bei speziellen Fragestellungen genutzt. Dagegen hat sich die nicht-invasive Hämodynamik durch Echokardiographie aufgrund der hohen Spezifität als Primärdiagnostik etabliert. Die Nutzung des 2D-Mode ermöglicht es, die Bewegungsabläufe des Herzens, die Größenverhältnisse und die anatomischen Auffälligkeiten zu beurteilen und im M-Mode quantitative Aussagen zur Ventrikel- und Vorhofgröße, zu Wanddicken, zur Geschwindigkeit der Wandbewegung und zu den Größenverhältnissen der Aorta zu treffen. Die Untersuchung ist eine schnelle und dem Herzkatheter gleichgestellte Methode, mit der die physiologischen und pathophysiologischen Herzfunktionen beurteilt werden können. Wir nutzten in unserer Studie die Echokardiographie für den Studienzeitraum von 8 Wochen als Verlaufskontrolle um neben den Verlauf der Hypertrophie des Herzens eine normale systolische Funktion mit einer linksventrikulären Auswurffraktion über 50 % zu bestimmen. Dabei stellt die LVEF einen relevanten Parameter zur Beurteilung der systolischen Funktion dar. Bedingt durch den schmalen linksthorakalen Bereich der Tiere, auf den der Schallkopf aufgesetzt wird, können Fehler während einer Messung entstehen. Um diese Unterschiede zu minimieren, nutzten wir einen Schallkopf der Neonatologie. Dadurch konnten potentielle Fehler, die durch einen zu großen Schallkopf auf zu kleiner Schallfläche entstehen können, minimiert werden. Nach der Verlaufskontrolle mittels Echokardiographie erfolgte die finale Konduktanzmessung mit einem Linksherzkatheter. Diese tierphysiologische Untersuchung durch einen Katheter mit Konduktanz ist erst in den letzten Jahren entwickelt worden, gehört aber heute zum Goldstandard der tierphysiologischen Messungen am Herzen. Durch diese Untersuchung war es möglich, Vorlast- und Nachlast-unabhängige Parameter wie die endsystolische Druck-Volumen-Beziehung (ESPVR) und die enddiastolische Druck-Volumen-Beziehung zu messen (EDPVR). Diese Parameter sind so genannte „load-dependent“-Parameter. Durch eine kurzfristige Vorlastsenkung ist es möglich, diese Werte unabhängig von der hämodynamischen Situation also unabhängig von dem im linken Ventrikel vorherrschenden Volumen auszuwerten. Hier zeigt sich der

entscheidende Vorteil gegenüber der Echokardiographie, die als Untersuchung der Herzkatheteruntersuchung gleichgestellt ist. Daher gilt der EDPVR mit seiner Aussage über die intrinsische Steifigkeit des linken Ventrikels während der diastolischen Dehnung durch die Blutfüllung hier unabhängig von der Volumensituation als stabil und sehr aussagekräftig für die Funktion einer diastolischen Funktionsstörung. Somit können Rückschlüsse über die Dehnbarkeit des linken Ventrikels getroffen werden.

4.1.3. Anästhesie

Vor den Untersuchungen mittels Echokardiographie und Linksherzkatheter wurden die Tiere narkotisiert. Es wurde darauf geachtet, dass die Tieren ausreichend sediert waren, so dass Einflüsse einer Schmerzsymptomatik auf das Herz-Kreislaufsystem minimiert werden konnten. Nach erfolgter Intubation und Ventilation der Tiere setzten wir einen Schmerzreiz. Folgte keine Abwehrreaktionen des Tieres wurde die Narkose für die Untersuchung als ausreichend betrachtet. Wir nutzten in unserer Studie ein mittellang wirkendes Barbiturat (Phenobarbital mit einer Halbwertszeit von 10-bis 18 Stunden) mit einer Dosierung von 50 mg/kg Körpergewicht. Phenobarbital wird heute in der Klinik nur noch als Antiepileptikum bei generalisierten und fokalen Anfällen eingesetzt. Phenobarbital besitzt eine sedierende, antikonvulsive, anxiolytische, muskelrelaxierende und hypnotische Wirkung. Aufgrund der geringen therapeutischen Breite zwischen sedierender und letaler Dosis wurden die Tiere gewogen und die Konzentration der Narkosen einzeln berechnet. Phenobarbital besitzt lipophile Eigenschaften. Dies führt zu einem raschen Anfluten des Wirkstoffs in das ZNS und unkontrollierter Verteilung in das periphere Fettgewebe. Nachspritzen wurde aufgrund der schlechten Steuerbarkeit der Narkose vermieden. In Studien konnte gezeigt werden, dass Barbiturate in ausreichender Sedierung nur eine geringe Wirkung auf die kardiale Funktion besitzen und die Nachlast nicht beeinflussen. Die kardio-depressive Wirkung von Barbituraten zeigt sich am ehesten in einer Beeinflussung der Inotropie mit Abnahme der Kontraktilität. Da aber alle Tiere mit Phenobarbital anästhesiert wurden, sollte der Fehler systemisch sein und die Ergebnisse nicht verfälschen. Phenobarbital zeigt in Studien aber entscheidende Vorteile gegenüber anderen möglichen Injektionsnarkotika, nämlich durch das geringe Nebenwirkungsspektrum auf das Herz-Kreislaufsystem und die Vorteile einer raschen Anästhesie. Eine wichtige, zu

untersuchende Frage stellt die Beurteilung der durch Phenobarbital induzierten gesteigerten Enzymaktivität von Cytochrom P450 in der Leber dar, das möglicherweise zu einer Interaktion mit dem Studienmedikament S803 führen könnte.

4.2. Ergebnisse

4.2.1. Systolische Funktion

Die systolische Funktion wurde innerhalb des Untersuchungszeitraums echokardiographisch im Abstand von je zwei Wochen kontrolliert. Dabei war es entscheidend, den jeweils richtigen Zeitpunkt zu bestimmen, damit eine isolierte diastolische Dysfunktion erkennbar ist und keine – durch den arteriellen Hypertonus bedingten – systolischen Funktionsstörungen auftreten und zu einer möglichen Globalinsuffizienz des Herzens führen. Zur Beurteilung der Systole richteten wir uns nach den Leitlinien der Society of Cardiology, die als Diagnosekriterium eine normale systolische Funktion mit einer über 50 %igen Auswurfraction des Herzens (LVEF) fordert [4]. Wir stützten uns auf dieses Kriterium, um in unserer Studie die linksventrikuläre Auswurfphase zu beurteilen. Dabei konnten wir im gesamten Studienzeitraum bei allen Tiergruppen keine Einschränkung der systolischen Funktion finden. Nachdem wir dieses Kriterium erfüllt haben, interessierte uns als nächstes, ob eine Hypertrophie aufgrund des arteriellen Hypertonus aufgetreten ist. Zur Untersuchung nutzten wir die Möglichkeit der Echokardiographie zur Berechnung des LVH-Indexes. Dabei konnten wir in unserem Studienverlauf die Hypertrophie des Myokards bestätigen. Denn zeigte sich zu Beginn ein nicht signifikanter, geringer Anstieg des LVH-Indexes bei den Salztieren HFNEF und HFNEFeNOS, konnten wir am Ende der Studie einen signifikanten Unterschied des LVH-Indexes gegenüber den Kontrolltieren feststellen. Dieses Ergebnis war zu erwarten, denn bis zu einem physiologischen Grad unterstützt die Hypertrophie das Herz. Denn die Hypertrophie stellt einen sich über den Studienzeitraum entwickelnden Kompensationsmechanismus dar, um gegen die gesteigerte Nachlast aufgrund des hypertensiven Kreislaufsystems zu reagieren. Es muss sichergestellt werden, dass ein adäquates Volumen in der Systole aus dem linken Ventrikel ausgeworfen werden kann. Die Hypertrophie stellt

aber keine akute Anpassung des Herzens an den arteriellen Hypertonus dar. Das Herz besitzt physiologische Mechanismen, um auf akute Volumenbelastungen zu reagieren. Diese akute Anpassung erfolgt bis zu einem gewissen Grad über den Frank-Starling-Mechanismus, bei dem das Herz bei erhöhter Vorlast mit dadurch Volumen-bedingter diastolischer Vordehnung ein erhöhtes systolisches Schlagvolumen aufweist. Ausserdem spielt der Bowditch-Effekt eine Rolle, bei dem aufgrund der Herzfrequenzsteigerung die Inotropie zunimmt. Die Hypertrophie des Myokards dagegen resultiert aus einer chronischen Druckbelastung, bei der akute Adaptionsmechanismen nicht mehr ausreichen. Die Kardiomyozyten entwickeln eine Hypertrophie des Herzens ohne relevante Erhöhung der Anzahl an Kardiomyozyten. Nachdem vermutet worden ist, dass Kardiomyozyten nicht in der Lage sind sich zu teilen, konnte die Arbeitsgruppe von Quaini eine langsame Proliferation dieser Zellen nachweisen [140]. Es ist aber bekannt, dass bei Patienten mit arteriellem Hypertonus und systolischer Funktionsstörung eine exzentrische Hypertrophie mit Abnahme der relativen Wanddicke und einer Zunahme des linksventrikulären enddiastolischen Durchmessers beobachtet werden kann. Im Gegensatz dazu entwickelt sich bei Patienten mit Bluthochdruck und diastolischer Dysfunktion eine konzentrische Hypertrophie mit Zunahme der relativen Wanddicke und Abnahme des linksventrikulären enddiastolischen Durchmessers [45]. Eine Folge der progredienten Myokardhypertrophie ist die Unterversorgung des Myokards mit Sauerstoff. Ebenfalls verursacht der arterielle Hypertonus eine Erhöhung der Wandspannung und führt zu Mikroläsionen des Endothels. [141,142]. Nachdem wir die Hypertrophie im Verlauf bestätigten konnten, möchte ich nun den Einfluss des Medikamentenprototyps S803 auf die Hypertrophie bei den behandelten Tieren darstellen. Aus den in M-mode gewonnenen Wert konnte der LVH-Index als auch das Herzgewicht berechnet werden. In unserer Studie konnten wir eine signifikante Senkung des LVH-Index am Ende der 8. Woche bei den HFNEFeNOS-Tieren im Gegensatz zu der Placebo-behandelten Gruppe HFNEF feststellen. Dieser Parameter entwickelte aber erst im Verlauf seine Signifikanz. Die Ursache hierfür liegt vermutlich in der bekannten antihypertrophen Wirkung von Stickstoffmonoxid (NO), was wiederum auf eine mögliche gesteigerte Expression der eNOS zurückzuführen ist. Es ist aber zu erwähnen, dass nur eine Beeinflussung des LVH-Indexes bei den hypertensiven und behandelten Tieren zu finden war, so dass zu vermuten ist, dass nur bei einem aktivierten hypertensiven Zustand des Herz-Kreislaufsystems die pharmakologisch gesteigerte eNOS-

Expression antihypertrophe Wirkung entfalten kann. Ebenfalls ist zu diskutieren, ob eine erhöhte NO-Produktion ausschließlich auf den eNOS-enhancer S803 zurückzuführen ist. Denn aufgrund der Entzündungsreaktion, die durch die chronische Druckbelastung ausgelöst wird, könnte auch eine gesteigerte Produktion der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) die Ergebnisse beeinflussen, da jene zu sehr hohen Konzentrationen an NO im toxischen Bereich führt, aber bei physiologischen Konzentrationen ebenfalls antihypertroph wirken kann.

In der Zusammenschau der systolischen Parameter lässt sich bei den Tieren mit einer speziellen Salzdiät HFNEF und HFNEFeNOS eine hyperdynamische und hyperkontraktile systolische Herzfunktion feststellen. Klare Indikatoren für diese hyperkontraktile LV-Funktion unter basalen Bedingungen sind die erhöhte Ejektionsfraktion, die erhöhte maximale Druckabfallgeschwindigkeit ($dp/dt \max$) und der erhöhte linksventrikuläre endsystolische Druck (LVESP). Der LVESP bestätigt, dass die Tiergruppen HFNEF und HFNEFeNOS einen arteriellen Hypertonus haben. Es zeigt sich aber kein Unterschied im LVESP zwischen den hypertensiven Gruppen. Somit hat S803 keinen Einfluss auf den arteriellen Hypertonus. Weitere Zeichen der hyperdynamischen systolischen Funktion sind in der Kontraktionsgeschwindigkeit als auch in den Werten des endsystolischen Drucks zu finden. Diese Parameter spiegeln die LV-Hypertrophie wider. Entwickelt sich bei den Tieren ein arterieller Hypertonus. Aufgrund der Sympathikusaktivierung des Herz-Kreislaufsystems kommt es zu Kompensationsmechanismen mit Inotropie- und Auswurfssteigerung des Herzens. Es werden das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System und anderer Neurohormone, die zur Vasokonstriktion der hauptsächlich arteriellen aber auch der venösen Gefäße mit Vor- und Nachlaststeigerung am Herzen, erhöhter Noradrenalin-Konzentration im Blutplasma und gesteigerter Natrium- und Wasserretention führen, aktiviert. Die durch den Sympathikus stimulierten β -Rezeptoren bewirken eine vermehrte Expression von Zytokinen wie TNF- α , TNF- β , IL-1 und IL-6, die wiederum eine Induktion der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) bewirken, die zu Schäden des Herzens aufgrund toxischer Konzentrationen an NO führen kann [143]. Bei chronisch hohen Plasmaspiegeln an Katecholaminen reagiert das Herz mit einer „downregulation“ der β_1 -Rezeptoren des Myokards und einer Funktionsstörung der Druckrezeptoren, infolge dessen der Sympathikotonus weiter steigt [144], [145]. Die Vor- und Nachlast am Herzen sind erhöht und können aufgrund der zunehmenden und chronischen Belastung

des Herzens zu pathologischen Veränderungen der Herzstruktur und Herzfunktion führen.

Um die Ergebnisse der systolischen Funktion zu vervollständigen, möchte ich auf das das HMV eingehen. Bei den Tiere mit der speziellen Salzdiät HFNEF und HFNEFeNOS zeigte sich ein signifikant vermindertes HMV. Das HMV wird aus dem Produkt von Herzfrequenz und Schlagvolumen berechnet. Somit resultiert ein niedriges HMV aus dem signifikant niedrigen Schlagvolumen (SV), das bei den Ratten mit spezieller Salzkost HFNEF und HFNEFeNOS gemessen wurde. Diese Beobachtung lässt wiederum ein vermindertes enddiastolisches Volumen (EDV) vermuten, welches dann in der folgenden Systole ausgeworfen werden kann. Diese Vermutung konnten wir schließlich echokardiographisch bestätigen. Denn die Tiere mit der Salzkost HFNEF und HFNEFeNOS entwickelten eine signifikante Minderung des EDVs am Ende der 8. Woche, was durch eine konzentrisch bedingten Hypertrophie mit Abnahme des enddiastolischen Durchmessers erklärbar ist. Die gemessenen Daten der systolischen Funktion im hypertensiven Dahl-Salz-sensitiven Rattenmodell sind vergleichbar mit den gewonnenen Daten aus anderen Arbeiten mit diesem Tiermodell.

4.2.2. Diastolische Funktion

Eine diastolische Dysfunktion manifestiert sich mit einer isovolumetrischen Verzögerung der Relaxation mit einer Zunahme der Steifigkeit des Myokards und verminderter linksventrikulärer Dehnbarkeit [4]. Das sind die pathophysiologischen Ursachen, die für die diastolischen Funktionsstörungen verantwortlich sind. Ein Diagnosekriterium stellt die normale systolische Funktion mit einer LVEF über 50% dar, die wir durch Echokardiographie und Konduktanzmessungen bestätigen konnten. In unserer Studie zeigten wir, dass die Tiergruppen sich nicht nur in den Vor- und Nachlast-unabhängigen Parametern, sondern auch in den Vor- und Nachlast-abhängigen Parametern unterschieden. Eine Verbesserung der diastolischen Funktion zeigte sich in einer signifikanten Reduktion des linksventrikulären enddiastolischen Drucks (LVEDP) bei den Tiergruppen mit einer Salzer Ernährung HFNEF und HFNEFeNOS gegenüber den Kontrolltieren KON und KONeNOS. LVEDP stellt dabei einen Vor- und Nachlast-abhängigen Parameter dar, also ein Wert der abhängig vom Volumen ist. Dabei konnte eine signifikante Abnahme des LVEDP bei den HFNEFeNOS-Tieren gegenüber der

hypertensiven Kontrollgruppe HFNEF gemessen werden. Dies lässt die Wirkung einer gesteigerten eNOS Aktivität vermuten. Denn NO aktiviert die Guanylcyclase und führt zu einer Relaxation der glatten Muskulatur. Dies beeinflusst die Dehnbarkeit des Myokards, was möglicherweise den intraventrikulären Druckanstieg in der Füllungsphase reduziert. Dagegen ist die signifikante Erhöhung des LVEDP bei den Salzgruppen HFNEF und HFNEFeNOS klar durch die konzentrische Hypertrophie mit Abnahme des linksventrikulären enddiastolischen Durchmessers erklärbar. Die durch die diastolische Dysfunktion entstandene Relaxationsstörung führt zu einer verminderten Dehnbarkeit des Myokards mit Verminderung des enddiastolischen Volumens (EDV), was sich in unseren Messungen bestätigte. Denn der Einstrom von Blutvolumen in einen aufgrund der Hypertrophie verkleinerten Ventrikel führt zu einer Erhöhung des Drucks in der Diastole. Aber betrachten wir zunächst weitere Ergebnisse, welche die in meiner Einleitung dargelegten Fragen beantworten. Als interessantester und sensitivster Parameter zur Beurteilung der diastolischen Funktion untersuchten wir den Vor- und Nachlast-unabhängigen Wert, nämlich die enddiastolische Druck-Volumen-Beziehung EDPVR. Dabei gibt es unterschiedliche Wege um diesen Parameter zu berechnen. Es gibt die Möglichkeit, aus einzelnen Herzschlägen ohne direkte Vorlastsenkung die EDPVR zu bestimmen, allerdings gilt die direkte Erfassung der Relaxation an aneinander folgenden Herzschlägen während einer Vorlastsenkung als genauer und zuverlässiger. Daher bietet sich diese Messung besonders im Tiermodell an. Bei Erreichen des höchsten linksventrikulären enddiastolischen Druckes und Volumens in der Kurve wird entweder eine lineare oder eine exponentielle Funktion durch die einzelnen enddiastolischen Druck-Volumen-Punkte gelegt. Es ist aber einfacher, einen gemeinsamen Punkt der größtmöglichen mathematischen Annäherungen mit Hilfe einer exponentiellen Funktion zu finden und so den Wert EDPVR zu berechnen. Die EDPVR ist ein Parameter zur Beurteilung der myokardialen Steifigkeit. Dabei konnten wir deutlich den signifikanten Unterschied im EDPVR zwischen den Tieren mit einer Salznahrung HFNEF und HFNEFeNOS und den Kontrollgruppen KON und KONE NOS zeigen. In den beiden Salztiergruppen unterschied sich die EDPVR signifikant zwischen den behandelten Tiere mit dem eNOS-enhancer S803, HFNEFeNOS, und den Tieren mit Placebo, HFNEF. Auch beim Menschen ist eine Messung der EDPVR durch Aufzeichnung von Druck-Volumen-Kurven mittels Konduktanzmessung während einer Herzkatheteruntersuchung durch Aufblasen eines Ballons zur Okklusion der *V.cava inferior* möglich [38]. Tschöpe und

seine Arbeitsgruppe führten eine der größten klinisch-randomisierten Studien zur Untersuchung der HFNEF am Menschen durch. Dabei wurden 70 Patienten beobachtet, die klinische Symptome einer Herzinsuffizienz aufwiesen und deren Krankheitsgeschichte rezidivierende stationäre Behandlungen beinhaltete. Alle Patienten wurden nach nicht-kardialen Ursachen für die klinischen Symptome gescreent. Aus der Studie ausgeschlossen wurden Patienten, bei denen während der Untersuchungen zusätzlich kardiale Krankheiten wie Vorhofflimmern, KHK, Kardiomyopathie und Klappenfehler festzustellen waren. Die Patienten nahmen an echokardiographischen und Konduktanz-Messungen mittels Linksherzkatheter teil. Dabei zeigte sich in der Echokardiographie eine konzentrische Hypertrophie mit signifikanter Zunahme des Herzgewichts und in den Konduktanzmessungen ein signifikanter Anstieg des LVEDP und eine erhöhte EDPVR bei den Patienten mit HFNEF gegenüber der Kontrollgruppe. Die durch pacinginduzierte Tachykardie führte bei Patienten mit HFNEF zu einer signifikanten Verminderung des Schlagvolumens. Dagegen war bei Belastungsübungen, die die Patienten während der Untersuchungen durchführten, ein signifikanter Anstieg des LVEDP zu messen. Beide Untersuchungen erbrachten aber keine signifikante Veränderung der EDPVR. So lässt sich in dieser Studie deutlich die Korrelation des Wertes EDPVR mit der diastolischen Funktion darstellen. Ebenfalls lässt sich aus dieser Studie vermuten, dass Veränderungen der EDPVR mit der Ausprägung der klinischen Symptome korreliert [38].

Wie bereits erwähnt, stellen sich in unseren Messungen eine signifikante Zunahme der myokardialen Steifigkeit (EDPVR) und erhöhte Werte für LVEDP dar, wobei zu vermuten ist, dass eine Erhöhung der EDPVR zu einer Erhöhung des LVEDP führt, und EDPVR entscheidend von der Hypertrophie des Myokards beeinflusst wird. Somit spielt auch in unserer Studie der gemessene Parameter EDPVR die entscheidende Rolle zur Beurteilung der diastolischen Herzfunktion.

Wie aber ist diese signifikante Zunahme von LVEDP und EDPVR bei denen mit Placebo und medikamentös behandelten Hypertoniegruppen erklärbar? Die EDPVR kann sich aus unterschiedlichen Gründen verändern. Betroffen sein können myokardiale und extra-myokardiale Veränderungen histologischer Strukturen und biochemische Prozesse. Diese pathologischen Prozesse können innerhalb einer Herzmuskelzelle durch mögliche Titin-Veränderungen auftreten oder sich in der umgebenden extrazellulären Matrix manifestieren, was möglicherweise einen gestörten Kollagenstoffwechsel zur Folge hat und zu einer Zunahme der kardialen Fibrose führt.

Extramyokardial werden diese Vorgänge wiederum in Form einer Systemaktivierung, wie zum Beispiel durch das RAA-, ANP- und BNP-System oder den Sympathikus beeinflusst [31]. Eine wichtige Rolle spielt das im Sarkomer enthaltene Protein Titin, das die Längsdehnung der Kardiomyozyten beeinflusst. Das Protein spannt sich von der Z-Bande bis zur M-Linie des Sarkomers. Titin ist verantwortlich für die Dehnung des Ventrikels über die Sarkomerlänge hinaus, indem es sich in der Diastole wie eine Sprungfeder spannt, um in der Systole wieder in seinen entspannten Zustand zurückzukehren [59,65]. Dabei existieren zwei verschiedenen Isoformen des Titins. Das Titin mit einem kurzen Segment besitzt eine geringere Dehnbarkeit und eine erhöhte passive Steifheit, während das Titin mit einem längeren Segment eine größere Längenveränderung und Dehnbarkeit des Kardiomyozyten ermöglicht [62,63]. Bei einem gesunden Herz sind beide Isoformen annähernd gleich exprimiert. Eine mögliche Theorie, die die Störung der diastolischen Funktion erklärt, ist, dass es zu einem Wechsel der Titin-Isoformen mit Veränderung des Titin-Verhältnisses kommt. Es konnten im experimentellen Endstadium einer dilatativen Kardiomyopathie, aufgrund durchgeführter Myokardbiopsien, Veränderungen der Titin-Isoformen festgestellt werden, die mit einer Zunahme der Steifigkeit des Myokards korrelierten [59]. Ausserdem konnte bei erhöhter Druckbelastung des Herzens ein Anstieg der Dichte von Mikrotubulli beobachtet werden, was zu einer Minderung der Elastizität und zu erhöhter Steifigkeit der Kardiomyozyten und des Myokards führt [146]. Aufgrund der pathologisch gemessenen Werte aus der Echokardiographie und Konduktanzmessung lässt sich vermuten, dass es einen Zusammenhang zwischen den gewonnenen Werten und der Veränderung der Titin-Isoformen und Gesamtkonzentration innerhalb des Kardiomyozyten gibt. In unserer Studie konnten keine Veränderungen der Titin-Isoformen festgestellt werden [38]. Somit führt in unserer Studie nicht der arterielle Hypertonus aufgrund von Titin-Veränderung zu einer Relaxationsstörung des linken Ventrikels, sondern es müssen andere Ursachen für die gestörte diastolische Funktion bei den hypertensiven Gruppen verantwortlich sein. Die gewonnenen Ergebnisse spiegeln aber nur die gestörte Physiologie der Diastole wieder. Was können aber für strukturelle Veränderungen in der extrazellulären Matrix festgestellt werden? Hierzu möchte ich, wie bereits erwähnt, auf eine weitere pathophysiologische Ursache, die zur diastolischen Dysfunktion mit erhöhter Steifheit und geringerer Dehnbarkeit des linken Ventrikels führt, eingehen. Dies betrifft den Kollagenstoffwechsel der in den Fibroblasten, in der extrazellulären Matrix stattfindet. Das den Kardiomyozyten umgebende Bindegewebe

verhindert die Überdehnung und das Auseinandergleiten der Herzmuskelzellen. Eine wichtige Rolle spielt dabei die Konzentration der verschiedenen Kollagenarten, die durch ihre elastischen Eigenschaften die physiologische Relaxation beeinflussen. Bedingt durch die arterielle Druckbelastung des Herz-Kreislaufsystems kommt es zu einer Induktion des Kollagenstoffwechsels. Die Bildung von Kollagen findet dabei in Fibroblasten statt, die durch biochemische oder physikalische Reize aktiviert werden. Dabei spielen erhöhte Konzentrationen an Zytokinen und die Druckbelastung aufgrund des arteriellen Hypertonus eine wichtige Rolle. Denn der arterielle Hypertonus bewirkt eine gesteigerte Zytokinproduktion, die wiederum eine gesteigerten Kollagenproduktion zur Folge hat. Der Abbau von Kollagen findet dagegen durch Zink-abhängige Metalloproteasen (MMP) statt, die ebenfalls in Fibroblasten gebildet werden [73,75,76]. Wie bereits erwähnt, wird aufgrund der Druckbelastung des Herzens eine gesteigerte Kollagenbiosynthese in den Fibroblasten induziert, aber ebenfalls führt der arterielle Hypertonus zu einer Störung des Kollagenabbaus mit Folgen unkoordinierter Abbauprozesse und verminderter Kollagenreduktion [72]. Ausserdem werden Fibroblasten durch die Druckbelastung angeregt zu proliferieren, was eine weitere erhöhte Produktion von Kollagen bewirkt. Im Gegensatz dazu führt das Zusammenspiel von BNP und ANP und anderen signalaktiven Molekülen, wie beispielsweise TNF- α , zu einer vermehrten Aktivierung Kollagen-Abbauender Enzyme (MMPs) [77,78].

Es können zwei Arten von Kollagen in den Fibroblasten gebildet werden. Kollagen I ist ein Stahl-ähnliches Kollagen, Kollagen Typ III besitzt elastische Eigenschaften. Die Form der kardialen Fibrose, die zu einer vermehrten Steifheit des Myokards führt, konnte am Tiermodell der diabetischen Kardiomyopathie durch erhöhte Konzentrationen an Stahl-ähnlichem Kollagen I gezeigt werden [38]. In Myokardbiopsien bei Patienten mit hypertensiver Herzerkrankung zeigte sich in den Auswertungen ebenfalls eine erhöhte Kollagen I Konzentration [79]. Dies ist eine mögliche Begründung für die Abnahme der Relaxation und Zunahme der passiven Steifigkeit. Denn bei einem chronisch bestehendem arteriellen Hypertonus entsteht ein Ungleichgewicht zwischen den endogenen Substanzen, die die Kollagensynthese in den Fibroblasten inhibieren oder eine Aktivierung der MMPs induzieren, wie das Zytokin TNF- α , die natriuretischen Peptide ANP und BNP und das Molekül NO. Demgegenüber führt die chronische Druckbelastung durch den arteriellen Hypertonus zu einer Aktivierung des Sympathikus und des RAAS, was wiederum durch Angiotensin II zu einer gesteigerten Kollagenbiosynthese führt und zur Proliferation der Fibroblasten

anregt [72]. Somit ist das Zusammenspiel der Inhibition und Induktion der Kollagensynthese und deren Abbau entscheidend.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde das Myokard der einzelnen Gruppen durch Picro-Sirius-Rot-Färbung untersucht, um das Ausmaß der kardialen Fibrose zu beurteilen. Dabei konnte eine signifikante Zunahme der kardialen Fibrose bei den HFNEF-Tieren gegenüber den Kontrolltieren festgestellt werden. Im Gegensatz dazu führt die Behandlung mit S803 bei den HFNEFeNOS-Tieren zu einer signifikanten Reduktion der kardialen Fibrose. Die HFNEFeNOS-Tiere erreichten gleichwertige Ergebnisse in der PSR-Färbung wie die Tiere in den Kontrollgruppen KON und KONeNOS. Somit ist die sich in den gemessenen Werten widerspiegelnde verminderte Dehnbarkeit und Steifheit des linksventrikulären Myokards durch die signifikante Zunahme des Kollagens und damit durch die Zunahme der kardialen Fibrose erklärbar. Dabei wurde aber nicht zwischen den verschiedenen Kollagenarten unterschieden. Anhand der gewonnenen Ergebnisse scheint es möglich, dass es zu einer vermehrten Konzentration an Kollagen I kommt. Diese Vermutung muss aber durch weitere molekularbiologische Tests des Myokards erst untersucht werden, um das Verhältnis und die Konzentration von Kollagen I und Kollagen III zu bestimmen. Somit konnten wir in der Zusammenschau der gewonnenen Ergebnisse in unserer Studie neben den antihypertrophen auch den antifibrotischen Effekt durch eine mögliche direkte Stimulierung der eNOS-Expression zeigen. Es existieren aber auch Medikamente, die ebenfalls zu einer Erhöhung der eNOS führen. Medikamente wie Nebivolol, Cholesterinesterasehemmer (Statine) sind zu nennen. Besonders bei Cholesterinesterasehemmern (Statine), die als pleiotrophe Effekte zu einer Steigerung der eNOS Konzentration führen, konnte in einer Arbeit von Fukuta et al. eine Reduktion der Mortalität bei Patienten mit HFNEF festgestellt werden [108]. In weiteren klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass auch Perindopril, ein ACE-Hemmer, der in der großen *EUROPA*-Studie getestet wurde, zu einer gesteigerten eNOS Produktion führt [147,148]. Trotz der klinischen Relevanz und hohen Prävalenz der HFNEF stehen bis heute keine adäquaten Leitlinien für eine mögliche Behandlung der HFNEF zur Verfügung. Aufgrund des frühzeitig malignen Verlaufs der klinischen Symptomatik bei einer systolischen Herzinsuffizienz und schnell echokardiographisch festzustellender systolischer Funktionseinschränkungen war die Pharmaindustrie zuerst daran interessiert, eine möglichst deutliche Verbesserung der Mortalität und Morbidität durch ein Pharmakon bei diesem gesonderten Patientenkollektiv zu zeigen. Deshalb wurden Medikamente entwickelt, die dann in den ersten großen Studien zur

Herzinsuffizienz (z.B. SOLVD, SAVE) bei Patienten durchgeführt wurden, die eine schlechte linksventrikuläre Pumpfunktion mit stark eingeschränkter LVEF unter 50% zeigten. Damit sind Patienten mit HFNEF aufgrund der hierbei bestehenden normalen LVEF aus den Studien ausgeschlossen worden. Erst in den letzten Jahren erfolgten große, randomisierte-Placebo-kontrollierte Studien, die gezielt mögliche Therapien für die diastolische Herzinsuffizienz untersuchten. Die erst kürzlich veröffentlichte Studie, I-Preserve, ist eine große randomisierte-Placebo-kontrollierte Studie zur Überprüfung möglicher Behandlungsstrategien einer HFNEF. Dabei wurde der AT-1 Antagonist Irbesartan gegenüber der Standardtherapie getestet. Dabei zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse gegenüber der Standardtherapie der diastolischen Herzinsuffizienz [149].

Im heutigen klinischen Alltag finden wir eine eher symptombezogene Behandlung, die gleich der Behandlung von Patienten mit HFREF ist. Das Hauptziel der zurzeit bestehenden Therapie beinhaltet die Reduktion der klinischen Symptomatik und die Verhinderung der weiteren Progression der Myokardhypertrophie.

4.2.3. Wirkung von NO

Die Wirkungsentfaltung auf Grund der antihypertrophen und antifibrotischen Eigenschaften des NO-enhancers S803 ist anhand der gemessenen Parameter deutlich zu erkennen. Der antihypertrophe Effekt zeigte sich am besten echokardiographisch und post mortem in einer signifikanten Reduktion des Herzgewichts. Weiterhin war ein signifikanter Rückgang der konzentrischen Hypertrophie zu verzeichnen, was sich auf Grund eines erhöhten EDV bei den HFNEFeNOS-Tieren gegenüber den Kontrolltieren vermuten lässt. Neben der Zellhypertrophie der Kardiomyozyten konnte eine im NEJM veröffentlichte Studie zeigen, dass auch bei Kardiomyozyten die Fähigkeit der Proliferation besteht. Prinzipiell könnte auch dies eine Rolle spielen, da aber die Proliferationsrate sehr gering ist, hat sie keinen entscheidenden Einfluss auf das Herzgewicht [140]. Eine Verbesserung des LVEDP lässt sich hauptsächlich auf den positiven Effekt von S803 auf die konzentrische Myokardhypertrophie mit einer Abnahme der Lumeneinengung des linken Ventrikels in der Diastole zurückführen. Neben der antihypertrophen Wirkung ist auch der antifibrotische Effekt von NO durch Hemmung der Proliferation von Fibroblasten bekannt [110]. Die Behandlung der

HFNEFeNOS-Tiere führte zu einer signifikanten Abnahme der linksventrikulären Steifheit, was sich am deutlichsten im Ergebnis EDPVR zeigt. Die Steifheit des linken Ventrikels ist neben der Titin-Theorie am besten durch die zunehmende kardiale Fibrose in der extrazellulären Matrix des Myokards erklärbar, zeigt sich doch bei den behandelten HFNEFeNOS-Tieren in der PSR-Färbung eine signifikante Reduktion der kardialen Fibrose die Normalwerte, wie die der Kontrollgruppen KON und KONE NOS erreichte. Damit lassen sich antifibrotische Effekte unter pharmakologischer eNOS-Aktivierung vermuten, da im Gegensatz dazu die signifikante massive Zunahme der kardialen Fibrose bei der hypertensiven Gruppe ohne S803 sich deutlich darstellte. Es ist aber noch nicht geklärt, inwieweit eine Beeinflussung der Produktion als auch des Abbaus der verschiedenen Kollagenarten durch NO erfolgt. Eine Verbesserung der myokardialen Steifigkeit durch erhöhte eNOS-Konzentrationen könnte sich möglicherweise in einer verminderten Konzentration an Kollagen I zeigen. Einerseits ist zu vermuten, dass NO eine direkte Hemmung der Kollagensynthese in den Fibroblasten zur Folge hat und andererseits durch Aktivierung der MMPs zu einer Verminderung der kardialen Fibrose führt. Es ist aber auch möglich, dass durch den arteriellen Hypertonus bedingte zunehmende Wandspannung des Atriums, die natriuretischen Peptide ANP und BNP von den Fibroblasten ausgeschüttet werden, die ebenfalls antihypertrophe und antifibrotische Eigenschaften besitzen. Dann aber wäre wiederum eine Reduktion der Fibrose als auch der Hypertrophie bei den HFNEF-Tieren zu finden, bei denen aufgrund des arteriellen Hypertonus eine erhöhte Wandspannung vorhanden war, was sich aber nicht bestätigte. So dass vermutlich die Effekt von ANP und BNP keinen Einfluss in dieser Studie zeigten. Trotzdem kann in dieser Studie nicht unterschieden werden, ob die Verbesserung durch eine gesteigerte eNOS-Aktivierung stattgefunden hat oder ob es andere Kompensationsmechanismen gab, die für die positiven Veränderungen, die in unserer Studie gemessen werden konnten, verantwortlich sind. Die gewonnenen Daten lassen aber eine NO-Wirkung, die mit einer gesteigerten eNOS-Expression erklärbar ist, vermuten. Die Verminderung des EDPVR ist auf eine zunehmende diastolische Zelllänge, verbesserten Relaxation der glatten Muskulatur und Abnahme der myokardialen Steifigkeit aufgrund der NO-Wirkung zurückzuführen. Dabei kam es aber in dieser Arbeit trotz des vasodilatatorischen Effekts von NO zu keiner signifikanten Senkung des Blutdrucks bei der HFNEFeNOS-Gruppe. Schon Paulus und seine Arbeitsgruppe konnten die verbesserte Relaxation des Myokards bei direkter intrakoronarer NO-Applikation am humanen Herzen zeigen [113]. Es ist aber bisher kein

Medikament bekannt, welches über einen längeren Zeitraum verwendet werden kann, da sich eine Nitrattoleranz entwickelt. Aus diesem Grund wurden ein neuer pharmakologischer Wirkstoff entwickelt, der eNOS-enhancer. Es konnte in in-vitro Versuchen eine gesteigert eNOS-Genexpression auf zellulärer Ebene nachgewiesen werden [130]. Der vollständige Wirkmechanismus des eNOS-enhancers ist nicht geklärt. Es konnte in tierexperimentellen Studien, die mit einem eNOS-enhancer gearbeitet haben, eine vermehrte eNOS-Expression nachgewiesen werden. In in-vivo Versuchen, die die Wirkung eines eNOS-enhancers auf das Knochenmark einer Maus untersuchten [130] als auch eine Arbeit mit einem Streptozin induzierten diabetischen Rattenmodell, die die Wirkung einer eNOS-Aktivierung auf die endotheliale Dysfunktion untersuchten, zeigte sich in beiden Projekten eine nachweisbare, pharmakologisch erhöhte eNOS-Genexpression [38]. Um aber eine eindeutig fassbare gesteigerte Expression der eNOS und damit eine erhöhte Produktion an NO nachzuweisen, müssen weitere Untersuchungen des Myokards erfolgen. Diese Untersuchungen wurden nicht im Rahmen dieser Doktorarbeit von mir durchgeführt. Es wurden aber in der vollständigen Publikation meiner Arbeitsgruppe eine Real-time PCR (RT-PCR) zum Nachweis einer pharmakologisch gesteigerten eNOS-Genexpression angefertigt. Dabei zeigten sich eine erhöhte eNOS Gen-Expression bei den mit dem eNOS-enhancer behandelten Tieren HFNEFeNOS gegenüber den Placebo-Gruppen [38]. Mit diesem Ergebnis zeigt sich die gewünschte pharmakologische Wirkung des applizierten eNOS-enhancers. In den gewonnenen Daten der HFNEFeNOS-Tiere sind die positiven Ergebnisse der Hämodynamik als auch der kardialen Fibrose wahrscheinlich auf die pharmakologisch gesteigerte eNOS-Genexpression zurückzuführen. Es stellt sich aber die Frage, weshalb in der KONEFeNOS Gruppe keine signifikante Zunahme der eNOS-Genexpression nachgewiesen werden konnte. So läßt sich vermuten, dass ein eNOS-enhancer nur bei den kranken Tieren mit einer vermutlich gestörten eNOS-Aktivität seine positive Wirkung entfalten kann.

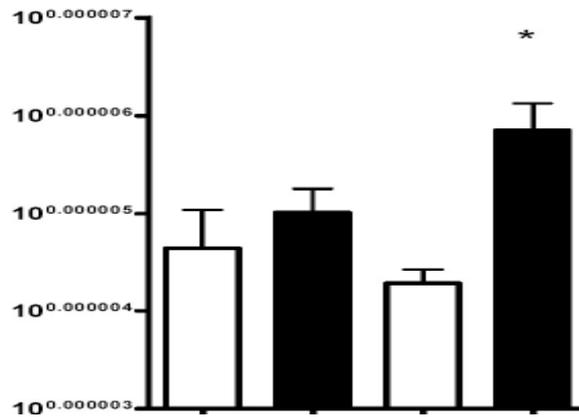


Abb. 9 : eNOS-Genexpression, $p < 0,05$ * HFNEFeNOS vs. KON, HFNEF (Westermann et al., 2009)

Dagegen konnten ähnliche Ergebnisse, die wir in unseren Hämodynamikparametern der HFNEFeNOS-Gruppe gefunden haben, ebenfalls in tierexperimentellen Arbeiten mit einem Phosphodiesterase-5-Inhibitor gemessen werden, da PDE-5-Inhibitoren Einfluss auf die NO-Synthese mit erhöhter Verfügbarkeit von NO haben [150]. In einer tierexperimentellen Arbeit, in der das Dahl-Salz-sensitive Rattenmodell die Grundlage bildete, wurde ein AT-1-Antagonist versus ein Statin in der Mono- gegenüber der Kombinationstherapie getestet. In den Auswertungen war in allen Gruppen eine signifikante Zunahme der eNOS-Aktivität gegenüber den Kontrollgruppen zu beobachten. Das eNOS-enhancement war in der Zweifachkombination additiv zu der Monotherapie. Bei den Statinen werden die pleiotropen Effekte auf die erhöhte eNOS-Aktivität zurückgeführt [151]. In einer tierexperimentellen Studie mit eNOS Knock-out Mäusen als Infarktmodell war in dieser Gruppe ein signifikant zunehmendes kardiales Remodelling vorhanden. Das kardiale Remodelling führte zu einer diastolischen Funktionsstörung [107]. In Zusammenschau der experimentellen Arbeiten spielt die verminderte eNOS-Aktivität eine wichtige Rolle in der Entwicklung einer diastolischen Herzinsuffizienz. Der Signalweg und die Aktivierung der eNOS ist noch nicht vollständig geklärt. Zusammenfassend zeigt sich in unserer und anderer Arbeiten mit Dahl-Salz-sensitiven Ratten, dass vermutlich ein eNOS-enhancement eine mögliche Therapieoption zur Behandlung einer diastolischen Herzinsuffizienz bei Patienten mit Salz-sensitivem arteriellen Hypertonus darstellt. Es müssen aber weitere Studien erfolgen.

4.3. Einschränkungen dieser Studie

Das Tiermodell der Dahl-Salz-sensitiven-Ratten ist in der Hypertonieforschung ein etabliertes Tiermodell und für die Untersuchung der Hypertonie-bedingten diastolischen Dysfunktion geeignet. Es existiert aber kein geeignetes Tiermodell, das bis auf Molekularebene dem Menschen ähnelt. So werden bei den Dahl-Ratten verschiedene Ursachen in Betracht gezogen, die für die Entwicklung eines Salz-induzierten arteriellen Hypertonus verantwortlich sind. Ausserdem ist in dieser Studie kein direkter Nachweis einer erhöhten NO- oder eNOS-Konzentration oder deren Metabolite erfolgt. Es stellt sich außerdem die Frage, ob Kompensationsmechanismen der Tiere diese Studie beeinflusst haben. Denn eine erhöhte Wandspannung durch den arteriellen Hypertonus führt zu einer gesteigerten Sekretion von ANP und BNP, die ebenfalls antihypertrophe und antifibrotische Eigenschaften besitzen und zu einer gesteigerten eNOS-Expression führen können [89,91]. Auch die Wirkung der iNOS, die durch den arteriellen Hypertonus aktiviert wird, kann zu den positiven Eigenschaften bei physiologisch vorherrschenden Konzentrationen von NO beitragen. Eine große Einschränkung dieser Studie ist die geringe Anzahl der Tiere. Dadurch können nur eingeschränkte Aussagen zur Wirkung von NO getroffen werden. Aufgrund der geringen Anzahl und der unterschiedlichen Mortalität im Studienverlauf durch z.B. die Anästhesie, konnten keine relevanten Auffälligkeiten in der Mortalität zwischen den verschiedenen Gruppen beobachtet werden. Nach den Richtlinien der *Society of Cardiology* konnten wir die diastolische Dysfunktion zwar feststellen, es fehlten aber die klinischen Symptome wie die Belastungsdyspnoe, um von einer diastolischen Herzinsuffizienz HFNEF zu sprechen. Zwar zeigten einige Tiere ein erhöhtes Lungenfeucht- und Lungentrockengewicht was für ein Lungenödem sprechen könnte, aber aufgrund des geringen Auftretens, konnte diese Beobachtung nicht als relevantes Kriterium mit einbezogen werden. Weiterhin wäre zu diskutieren, ob die pharmakologische Dosierung des eNOS-enhancers optimal gewählt worden ist. Dazu müssten erneute Studien mit verschiedenen Konzentrationen erfolgen. Die Bestimmung des E/E'- und E/A-Verhältnisses in der Echokardiographie zeigte sich als schwierig und fehlerhaft und wurde in unserer Studie nicht als Parameter zur Messung einer diastolischen Relaxationsstörung genutzt.

4.4. Zusammenfassung

Mit einer zunehmenden Prävalenz von 1% pro Jahr rückt die HFNEF zunehmend in den Blickpunkt klinischer und experimenteller Forschung [3]. Aufgrund der überarbeiteten Leitlinien durch die *Society of Cardiology* ist es möglich, eine HFNEF zu diagnostizieren. Besonders der arterielle Hypertonus stellt einen zentralen Risikofaktor bei der Entwicklung einer HFNEF dar. Die sich dadurch entwickelnden Symptome werden aber im heutigen klinischen Alltag unabhängig von einer systolischen oder diastolischen Funktionsstörung symptombezogen behandelt mit den Therapiezielen eine Reduktion der klinischen Symptomatik als auch Verhinderung der Progression der Herzhypertrophie. Als pathologische Ursachen für die Entwicklung einer diastolischen Funktionsstörung konnten Prozesse und Veränderungen in den Kardiomyozyten selbst und in der sie umgebenden extrazellulären Matrix oder neurohumoralen Systemaktivierung gefunden werden. Besondere Aufmerksamkeit gilt in dieser Hinsicht seit einigen Jahren dem Verständnis der eNOS und deren Produkt Stickstoffmonoxid. NO ist in einer großen Anzahl an physiologischen Prozessen involviert und beeinflusst konzentrationsabhängig die diastolische Funktion. Dieses Molekül wirkt über eine Erhöhung der Guanylcyclase mit folgendem c-GMP- Anstieg. Dieser Anstieg führt zu einer Relaxation der glatten Muskulatur und über diesen Weg zu einer Vasodilatation, einer Abnahme der myokardialen Steifigkeit und zu einer Zunahme der diastolischen Zelllänge. Der Zusammenhang zwischen dem arteriellen Hypertonus, der diastolischen Dysfunktion und einer vermutlich verminderten Expression der eNOS konnte in unserer Studie durch die pathologisch gemessenen Parameter der Hämodynamik als auch durch die Zunahme der Kollagenkonzentrationen dargestellt werden.

Wir haben in unserer Studie eine neue Medikamentengruppe, die eNOS-enhancer, getestet, die über eine pharmakologische Stimulierung eine gesteigerte Expression der eNOS bewirken und positiven Einfluss auf den Verlauf einer aufgrund des arteriellen Hypertonus bedingten diastolischen Funktionsstörung haben. Dies konnten wir anhand der gewonnenen Ergebnisse sowohl durch die Hämodynamik als auch durch die PSR-Färbung bei den HFNEFeNOS-Tieren, die mit dem eNOS-enhancer behandelt worden waren, zeigen. Somit könnten Therapiestrategien, die zu einer direkten Erhöhung der eNOS führen, eine neue zukünftige Option in der Therapie einer Herzinsuffizienz mit normaler Ejektionsfraktion HFNEF darstellen.

5. Anhang

5.1. Literaturverzeichnis

1. Remme WJ, Swedberg K: Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure. *Eur Heart J* 2001;22:1527-1560.
2. Vasan RS, Benjamin EJ, Levy D: Prevalence, clinical features and prognosis of diastolic heart failure: an epidemiologic perspective. *J Am Coll Cardiol* 1995;26:1565-1574.
3. Owan TE, Hodge DO, Herges RM, Jacobsen SJ, Roger VL, Redfield MM: Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med* 2006;355:251-259.
4. Paulus WJ, Tschope C, Sanderson JE, Rusconi C, Flachskampf FA, Rademakers FE, Marino P, Smiseth OA, De Keulenaer G, Leite-Moreira AF, Borbely A, Edes I, Handoko ML, Heymans S, Pezzali N, Pieske B, Dickstein K, Fraser AG, Brutsaert DL: How to diagnose diastolic heart failure: a consensus statement on the diagnosis of heart failure with normal left ventricular ejection fraction by the Heart Failure and Echocardiography Associations of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2007;28:2539-2550.
5. Jessup M, Brozena S: Heart failure. *N Engl J Med* 2003;348:2007-2018.
6. Gandhi SK, Powers JC, Nomeir AM, Fowle K, Kitzman DW, Rankin KM, Little WC: The pathogenesis of acute pulmonary edema associated with hypertension. *N Engl J Med* 2001;344:17-22.
7. Vasan RS, Larson MG, Benjamin EJ, Evans JC, Reiss CK, Levy D: Congestive heart failure in subjects with normal versus reduced left ventricular ejection fraction: prevalence and mortality in a population-based cohort. *J Am Coll Cardiol* 1999;33:1948-1955.
8. Gaasch WH, SE, Zile MR. : Management of left ventricular diastolic dysfunction. In: Smith TW, ed. *Cardiovascular Therapeutics: A Companion to Braunwald's Heart Disease*. Philadelphia, Pa: WB Saunders Co 1996.
9. Zile MR, Simsic JM: Diastolic heart failure: diagnosis and treatment. *Clin Cornerstone* 2000;3:13-24.
10. Zile MR, Gaasch WH, Carroll JD, Feldman MD, Aurigemma GP, Schaer GL, Ghali JK, Liebson PR: Heart failure with a normal ejection fraction: is measurement of diastolic function necessary to make the diagnosis of diastolic heart failure? *Circulation* 2001;104:779-782.
11. Philbin EF, Rocco TA, Jr.: Use of angiotensin-converting enzyme inhibitors in heart failure with preserved left ventricular systolic function. *Am Heart J* 1997;134:188-195.
12. Senni M, Tribouilloy CM, Rodeheffer RJ, Jacobsen SJ, Evans JM, Bailey KR, Redfield MM: Congestive heart failure in the community: a study of all incident cases in Olmsted County, Minnesota, in 1991. *Circulation* 1998;98:2282-2289.
13. Tarantini L, Faggiano P, Senni M, Lucci D, Bertoli D, Porcu M, Opasich C, Tavazzi L, Maggioni AP: Clinical features and prognosis associated with a preserved left ventricular systolic function in a large cohort of congestive heart failure outpatients managed by cardiologists. Data from the Italian Network on Congestive Heart Failure. *Ital Heart J* 2002;3:656-664.
14. Gottdiener JS, Arnold AM, Aurigemma GP, Polak JF, Tracy RP, Kitzman DW, Gardin JM, Rutledge JE, Boineau RC: Predictors of congestive heart failure in the elderly: the Cardiovascular Health Study. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:1628-1637.
15. Aurigemma GP, Gottdiener JS, Shemanski L, Gardin J, Kitzman D: Predictive value of systolic and diastolic function for incident congestive heart failure in the elderly: the cardiovascular health study. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:1042-1048.

16. Hogg K, Swedberg K, McMurray J: Heart failure with preserved left ventricular systolic function; epidemiology, clinical characteristics, and prognosis. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:317-327.
17. O'Connor CM, Gattis WA, Shaw L, Cuffe MS, Califf RM: Clinical characteristics and long-term outcomes of patients with heart failure and preserved systolic function. *Am J Cardiol* 2000;86:863-867.
18. Dauterman KW, Massie BM, Gheorghide M: Heart failure associated with preserved systolic function: a common and costly clinical entity. *Am Heart J* 1998;135:S310-319.
19. Judge KW, Pawitan Y, Caldwell J, Gersh BJ, Kennedy JW: Congestive heart failure symptoms in patients with preserved left ventricular systolic function: analysis of the CASS registry. *J Am Coll Cardiol* 1991;18:377-382.
20. Ho KK, Pinsky JL, Kannel WB, Levy D: The epidemiology of heart failure: the Framingham Study. *J Am Coll Cardiol* 1993;22:6A-13A.
21. Mureddu GF, de Simone G, Greco R, Rosato GF, Contaldo F: Left ventricular filling in arterial hypertension. Influence of obesity and hemodynamic and structural confounders. *Hypertension* 1997;29:544-550.
22. Ferrannini E, Buzzigoli G, Bonadonna R, Giorico MA, Oleggini M, Graziadei L, Pedrinelli R, Brandi L, Bevilacqua S: Insulin resistance in essential hypertension. *N Engl J Med* 1987;317:350-357.
23. Liu JE, Palmieri V, Roman MJ, Bella JN, Fabsitz R, Howard BV, Welty TK, Lee ET, Devereux RB: The impact of diabetes on left ventricular filling pattern in normotensive and hypertensive adults: the Strong Heart Study. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:1943-1949.
24. Cosson E, Guimfack M, Paries J, Paycha F, Attali JR, Valensi P: Prognosis for coronary stenoses in patients with diabetes and silent myocardial ischemia. *Diabetes Care* 2003;26:1313-1314.
25. Levy D, Larson MG, Vasan RS, Kannel WB, Ho KK: The progression from hypertension to congestive heart failure. *Jama* 1996;275:1557-1562.
26. Galderisi M: Diastolic dysfunction and diabetic cardiomyopathy: evaluation by Doppler echocardiography. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:1548-1551.
27. Gaasch WH, Zile MR: Left ventricular diastolic dysfunction and diastolic heart failure. *Annu Rev Med* 2004;55:373-394.
28. Crowie MR, WD, Coats AJS. : Incidence and aetiology of heart failure. *Eur Heart J* 1999;20:421-428.
29. Klein AL, Hatle LK, Taliercio CP, Taylor CL, Kyle RA, Bailey KR, Seward JB, Tajik AJ: Serial Doppler echocardiographic follow-up of left ventricular diastolic function in cardiac amyloidosis. *J Am Coll Cardiol* 1990;16:1135-1141.
30. Biondi B, Fazio S, Palmieri EA, Carella C, Panza N, Cittadini A, Bone F, Lombardi G, Sacca L: Left ventricular diastolic dysfunction in patients with subclinical hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:2064-2067.
31. Zile MR, Brutsaert DL: New concepts in diastolic dysfunction and diastolic heart failure: Part I: diagnosis, prognosis, and measurements of diastolic function. *Circulation* 2002;105:1387-1393.
32. Vasan RS, Levy D: Defining diastolic heart failure: a call for standardized diagnostic criteria. *Circulation* 2000;101:2118-2121.

33. Lang CC, Karlin P, Haythe J, Tsao L, Mancini DM: Ease of non-invasive measurement of cardiac output coupled with peak VO₂ determination at rest and during exercise in patients with heart failure. *Am J Cardiol* 2007;99:404-405.
34. How to diagnose diastolic heart failure. European Study Group on Diastolic Heart Failure. *Eur Heart J* 1998;19:990-1003.
35. McDonagh TA, Holmer S, Raymond I, Luchner A, Hildebrandt P, Dargie HJ: NT-proBNP and the diagnosis of heart failure: a pooled analysis of three European epidemiological studies. *Eur J Heart Fail* 2004;6:269-273.
36. Jones AE, Kline JA: Elevated brain natriuretic peptide in septic patients without heart failure. *Ann Emerg Med* 2003;42:714-715.
37. Tsutamoto T, Wada A, Sakai H, Ishikawa C, Tanaka T, Hayashi M, Fujii M, Yamamoto T, Dohke T, Ohnishi M, Takashima H, Kinoshita M, Horie M: Relationship between renal function and plasma brain natriuretic peptide in patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:582-586.
38. Riad A, Westermann D, Van Linthout S, Mohr Z, Uyumaz S, Becher PM, Rutten H, Wohlfart P, Peters H, Schultheiss HP, Tschope C: Enhancement of endothelial nitric oxide synthase production reverses vascular dysfunction and inflammation in the hindlimbs of a rat model of diabetes. *Diabetologia* 2008;51:2325-2332.
39. Garcia MJ, Smedira NG, Greenberg NL, Main M, Firstenberg MS, Odabashian J, Thomas JD: Color M-mode Doppler flow propagation velocity is a preload insensitive index of left ventricular relaxation: animal and human validation. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:201-208.
40. Nagueh SF, Middleton KJ, Kopelen HA, Zoghbi WA, Quinones MA: Doppler tissue imaging: a noninvasive technique for evaluation of left ventricular relaxation and estimation of filling pressures. *J Am Coll Cardiol* 1997;30:1527-1533.
41. Redfield MM, Jacobsen SJ, Burnett JC, Jr., Mahoney DW, Bailey KR, Rodeheffer RJ: Burden of systolic and diastolic ventricular dysfunction in the community: appreciating the scope of the heart failure epidemic. *Jama* 2003;289:194-202.
42. Khouri SJ, Maly GT, Suh DD, Walsh TE: A practical approach to the echocardiographic evaluation of diastolic function. *J Am Soc Echocardiogr* 2004;17:290-297.
43. Spirito P, Maron BJ: Relation between extent of left ventricular hypertrophy and diastolic filling abnormalities in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1990;15:808-813.
44. Koren MJ, Devereux RB, Casale PN, Savage DD, Laragh JH: Relation of left ventricular mass and geometry to morbidity and mortality in uncomplicated essential hypertension. *Ann Intern Med* 1991;114:345-352.
45. Erbel R, Neumann T, Zeidan Z, Bartel T, Buck T: [Echocardiography diagnosis of diastolic heart failure]. *Herz* 2002;27:99-106.
46. Levy D, Labib SB, Anderson KM, Christiansen JC, Kannel WB, Castelli WP: Determinants of sensitivity and specificity of electrocardiographic criteria for left ventricular hypertrophy. *Circulation* 1990;81:815-820.
47. Kasner M, Westermann D, Steendijk P, Gaub R, Wilkenshoff U, Weitmann K, Hoffmann W, Poller W, Schultheiss HP, Pauschinger M, Tschope C: Utility of Doppler echocardiography and tissue Doppler imaging in the estimation of diastolic function in heart failure with normal ejection fraction: a comparative Doppler-conductance catheterization study. *Circulation* 2007;116:637-647.

48. Oki T, Tabata T, Yamada H, Wakatsuki T, Shinohara H, Nishikado A, Iuchi A, Fukuda N, Ito S: Clinical application of pulsed Doppler tissue imaging for assessing abnormal left ventricular relaxation. *Am J Cardiol* 1997;79:921-928.
49. Mandinov L, Eberli FR, Seiler C, Hess OM: Diastolic heart failure. *Cardiovasc Res* 2000;45:813-825.
50. Ommen SR, Nishimura RA, Appleton CP, Miller FA, Oh JK, Redfield MM, Tajik AJ: Clinical utility of Doppler echocardiography and tissue Doppler imaging in the estimation of left ventricular filling pressures: A comparative simultaneous Doppler-catheterization study. *Circulation* 2000;102:1788-1794.
51. Mottram PM, Leano R, Marwick TH: Usefulness of B-type natriuretic peptide in hypertensive patients with exertional dyspnea and normal left ventricular ejection fraction and correlation with new echocardiographic indexes of systolic and diastolic function. *Am J Cardiol* 2003;92:1434-1438.
52. Garcia MJ, Thomas JD, Klein AL: New Doppler echocardiographic applications for the study of diastolic function. *J Am Coll Cardiol* 1998;32:865-875.
53. Nishimura RA, Tajik AJ: Evaluation of diastolic filling of left ventricle in health and disease: Doppler echocardiography is the clinician's Rosetta Stone. *J Am Coll Cardiol* 1997;30:8-18.
54. Brutsaert DL, Sys SU: Diastolic dysfunction in heart failure. *J Card Fail* 1997;3:225-242.
55. Ruzumna P, Gheorghide M, Bonow RO: Mechanisms and management of heart failure due to diastolic dysfunction. *Curr Opin Cardiol* 1996;11:269-275.
56. Baan J, Van der Velde ET: Sensitivity of left ventricular end-systolic pressure-volume relation to type of loading intervention in dogs. *Circ Res* 1988;62:1247-1258.
57. Kostin S, Hein S, Arnon E, Scholz D, Schaper J: The cytoskeleton and related proteins in the human failing heart. *Heart Fail Rev* 2000;5:271-280.
58. Cooper Gt: Cardiocyte cytoskeleton in hypertrophied myocardium. *Heart Fail Rev* 2000;5:187-201.
59. Cazorla O, Freiburg A, Helmes M, Centner T, McNabb M, Wu Y, Trombitas K, Labeit S, Granzier H: Differential expression of cardiac titin isoforms and modulation of cellular stiffness. *Circ Res* 2000;86:59-67.
60. Zile M: Diastolic dysfunction: Detection, consequences and treatment. Part I: Definition and determinants of diastolic function. *Mod Concepts Cardiovasc Dis* 1989;58:67-71.
61. Linke WA, Popov VI, Pollack GH: Passive and active tension in single cardiac myofibrils. *Biophys J* 1994;67:782-792.
62. Wu Y, Cazorla O, Labeit D, Labeit S, Granzier H: Changes in titin and collagen underlie diastolic stiffness diversity of cardiac muscle. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32:2151-2162.
63. Neagoe C, Kulke M, del Monte F, Gwathmey JK, de Tombe PP, Hajjar RJ, Linke WA: Titin isoform switch in ischemic human heart disease. *Circulation* 2002;106:1333-1341.
64. Wu Y, Bell SP, Trombitas K, Witt CC, Labeit S, LeWinter MM, Granzier H: Changes in titin isoform expression in pacing-induced cardiac failure give rise to increased passive muscle stiffness. *Circulation* 2002;106:1384-1389.
65. Bell SP, Nyland L, Tischler MD, McNabb M, Granzier H, LeWinter MM: Alterations in the determinants of diastolic suction during pacing tachycardia. *Circ Res* 2000;87:235-240.

66. van Heerebeek L, Borbely A, Niessen HW, Bronzwaer JG, van der Velden J, Stienen GJ, Linke WA, Laarman GJ, Paulus WJ: Myocardial structure and function differ in systolic and diastolic heart failure. *Circulation* 2006;113:1966-1973.
67. Weber KT, Brilla CG: Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation* 1991;83:1849-1865.
68. Covell JW: Factors influencing diastolic function. Possible role of the extracellular matrix. *Circulation* 1990;81:III155-158.
69. McKenna WJ: The future in hypertrophic cardiomyopathy: important clues and potential advances from an understanding of the genotype phenotype relationship. *Ital Heart J* 2000;1:17-20.
70. Kato S, Spinale FG, Tanaka R, Johnson W, Cooper Gt, Zile MR: Inhibition of collagen cross-linking: effects on fibrillar collagen and ventricular diastolic function. *Am J Physiol* 1995;269:H863-868.
71. Jalil JE, Doering CW, Janicki JS, Pick R, Shroff SG, Weber KT: Fibrillar collagen and myocardial stiffness in the intact hypertrophied rat left ventricle. *Circ Res* 1989;64:1041-1050.
72. Siwik DA, Pagano PJ, Colucci WS: Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;280:C53-60.
73. Spinale FG, Coker ML, Bond BR, Zellner JL: Myocardial matrix degradation and metalloproteinase activation in the failing heart: a potential therapeutic target. *Cardiovasc Res* 2000;46:225-238.
74. Nagatomo Y, Carabello BA, Coker ML, McDermott PJ, Nemoto S, Hamawaki M, Spinale FG: Differential effects of pressure or volume overload on myocardial MMP levels and inhibitory control. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;278:H151-161.
75. Fini M, Cook J, R. M, Brinckerhoff C: Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. In: Parks WC , Mecham RP , editors. *Matrix metalloproteinases*. New York: Academic 1988:299-359.
76. Vincenti MP: The matrix metalloproteinase (MMP) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) genes. Transcriptional and posttranscriptional regulation, signal transduction and cell-type-specific expression. *Methods Mol Biol* 2001;151:121-148.
77. Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML: The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2002;53:31-47.
78. Tsuruda T, Boerrigter G, Huntley BK, Noser JA, Cataliotti A, Costello-Boerrigter LC, Chen HH, Burnett JC, Jr.: Brain Natriuretic Peptide Is Produced in Cardiac Fibroblasts and Induces Matrix Metalloproteinases. *Circ Res* 2002;91:1127-1134.
79. Lopez B, Gonzalez A, Querejeta R, Larman M, Diez J: Alterations in the pattern of collagen deposition may contribute to the deterioration of systolic function in hypertensive patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:89-96.
80. Woessner JF, Jr.: Matrix metalloproteinase inhibition. From the Jurassic to the third millennium. *Ann N Y Acad Sci* 1999;878:388-403.
81. English WR, Puente XS, Freije JM, Knauper V, Amour A, Merryweather A, Lopez-Otin C, Murphy G: Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MMP17) has tumor necrosis factor-alpha convertase activity but does not activate pro-MMP2. *J Biol Chem* 2000;275:14046-14055.
82. Cheung BM, Kumana CR: Natriuretic peptides--relevance in cardiovascular disease. *Jama* 1998;280:1983-1984.

83. Fukui S, Fukumoto Y, Suzuki J, Saji K, Nawata J, Shinozaki T, Kagaya Y, Watanabe J, Shimokawa H: Diabetes mellitus accelerates left ventricular diastolic dysfunction through activation of the renin-angiotensin system in hypertensive rats. *Hypertens Res* 2009;32:472-480.
84. Espiner EA, Richards AM, Yandle TG, Nicholls MG: Natriuretic hormones. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1995;24:481-509.
85. Akabane S, Matsushima Y, Matsuo H, Kawamura M, Imanishi M, Omae T: Effects of brain natriuretic peptide on renin secretion in normal and hypertonic saline-infused kidney. *Eur J Pharmacol* 1991;198:143-148.
86. Burnett JC, Jr., Granger JP, Opgenorth TJ: Effects of synthetic atrial natriuretic factor on renal function and renin release. *Am J Physiol* 1984;247:F863-866.
87. Woods RL, Jones MJ: Atrial, B-type, and C-type natriuretic peptides cause mesenteric vasoconstriction in conscious dogs. *Am J Physiol* 1999;276:R1443-1452.
88. Oliver PM, Fox JE, Kim R, Rockman HA, Kim HS, Reddick RL, Pandey KN, Milgram SL, Smithies O, Maeda N: Hypertension, cardiac hypertrophy, and sudden death in mice lacking natriuretic peptide receptor A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:14730-14735.
89. Silberbach M, Gorenc T, Hershberger RE, Stork PJ, Steyger PS, Roberts CT, Jr.: Extracellular signal-regulated protein kinase activation is required for the anti-hypertrophic effect of atrial natriuretic factor in neonatal rat ventricular myocytes. *J Biol Chem* 1999;274:24858-24864.
90. Burnett JC, Jr., Opgenorth TJ, Granger JP: The renal action of atrial natriuretic peptide during control of glomerular filtration. *Kidney Int* 1986;30:16-19.
91. Calderone A: The therapeutic effect of natriuretic peptides in heart failure; differential regulation of endothelial and inducible nitric oxide synthases. *Heart Fail Rev* 2003;8:55-70.
92. Lubien E, DeMaria A, Krishnaswamy P, Clopton P, Koon J, Kazanegra R, Gardetto N, Wanner E, Maisel AS: Utility of B-natriuretic peptide in detecting diastolic dysfunction: comparison with Doppler velocity recordings. *Circulation* 2002;105:595-601.
93. Maisel AS, Krishnaswamy P, Nowak RM, McCord J, Hollander JE, Duc P, Omland T, Storrow AB, Abraham WT, Wu AH, Clopton P, Steg PG, Westheim A, Knudsen CW, Perez A, Kazanegra R, Herrmann HC, McCullough PA: Rapid measurement of B-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure. *N Engl J Med* 2002;347:161-167.
94. Morrison LK, Harrison A, Krishnaswamy P, Kazanegra R, Clopton P, Maisel A: Utility of a rapid B-natriuretic peptide assay in differentiating congestive heart failure from lung disease in patients presenting with dyspnea. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:202-209.
95. Berger R, Huelsman M, Strecker K, Bojic A, Moser P, Stanek B, Pacher R: B-type natriuretic peptide predicts sudden death in patients with chronic heart failure. *Circulation* 2002;105:2392-2397.
96. Radovits T, Korkmaz S, Loganathan S, Barnucz E, Bomicke T, Arif R, Karck M, Szabo G: Comparative investigation of the left ventricular pressure-volume relationship in rat models of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;297:H125-133.
97. Michel T, Feron O: Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest* 1997;100:2146-2152.
98. Shindo T, Ikeda U, Ohkawa F, Kawahara Y, Yokoyama M, Shimada K: Nitric oxide synthesis in cardiac myocytes and fibroblasts by inflammatory cytokines. *Cardiovasc Res* 1995;29:813-819.

99. Han X, Kobzik L, Balligand JL, Kelly RA, Smith TW: Nitric oxide synthase (NOS3)-mediated cholinergic modulation of Ca²⁺ current in adult rabbit atrioventricular nodal cells. *Circ Res* 1996;78:998-1008.
100. Ramaciotti C, Sharkey A, McClellan G, Winegrad S: Endothelial cells regulate cardiac contractility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:4033-4036.
101. Awolesi MA, Sessa WC, Sumpio BE: Cyclic strain upregulates nitric oxide synthase in cultured bovine aortic endothelial cells. *J Clin Invest* 1995;96:1449-1454.
102. Drexler H: Nitric Oxide Synthases in the Failing Human Heart : A Doubled-Edged Sword? *Circulation* 1999;99:2972-2975.
103. Kitakaze M, Node K, Minamino T, Kosaka H, Shinozaki Y, Mori H, Inoue M, Hori M, Kamada T: Role of nitric oxide in regulation of coronary blood flow during myocardial ischemia in dogs. *J Am Coll Cardiol* 1996;27:1804-1812.
104. Pinsky DJ, Patton S, Mesaros S, Brovkovich V, Kubaszewski E, Grunfeld S, Malinski T: Mechanical transduction of nitric oxide synthesis in the beating heart. *Circ Res* 1997;81:372-379.
105. Indik JH, Goldman S, Gaballa MA: Oxidative stress contributes to vascular endothelial dysfunction in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281:H1767-1770.
106. Kubo SH, Rector TS, Bank AJ, Williams RE, Heifetz SM: Endothelium-dependent vasodilation is attenuated in patients with heart failure. *Circulation* 1991;84:1589-1596.
107. Scherrer-Crosbie M, Ullrich R, Bloch KD, Nakajima H, Nasser B, Aretz HT, Lindsey ML, Vancon AC, Huang PL, Lee RT, Zapol WM, Picard MH: Endothelial nitric oxide synthase limits left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *Circulation* 2001;104:1286-1291.
108. Fukuta H, Sane DC, Brucks S, Little WC: Statin therapy may be associated with lower mortality in patients with diastolic heart failure: a preliminary report. *Circulation* 2005;112:357-363.
109. Takimoto E, Kass DA: Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling. *Hypertension* 2007;49:241-248.
110. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA: Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-142.
111. Calderone A, Thaik CM, Takahashi N, Chang DL, Colucci WS: Nitric oxide, atrial natriuretic peptide, and cyclic GMP inhibit the growth-promoting effects of norepinephrine in cardiac myocytes and fibroblasts. *J Clin Invest* 1998;101:812-818.
112. Smith JA, Shah AM, Lewis MJ: Factors released from endocardium of the ferret and pig modulate myocardial contraction. *J Physiol* 1991;439:1-14.
113. Paulus WJ, Vantrimpont PJ, Shah AM: Acute effects of nitric oxide on left ventricular relaxation and diastolic distensibility in humans. Assessment by bicoronary sodium nitroprusside infusion. *Circulation* 1994;89:2070-2078.
114. Paulus WJ, Shah AM: NO and cardiac diastolic function. *Cardiovasc Res* 1999;43:595-606.
115. Mohan P, Brutsaert DL, Paulus WJ, Sys SU: Myocardial contractile response to nitric oxide and cGMP. *Circulation* 1996;93:1223-1229.
116. Kim YM, Bombeck CA, Billiar TR: Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis. *Circ Res* 1999;84:253-256.

117. Mery PF, Pavoine C, Belhassen L, Pecker F, Fischmeister R: Nitric oxide regulates cardiac Ca²⁺ current. Involvement of cGMP-inhibited and cGMP-stimulated phosphodiesterases through guanylyl cyclase activation. *J Biol Chem* 1993;268:26286-26295.
118. Kelly RA, Balligand JL, Smith TW: Nitric oxide and cardiac function. *Circ Res* 1996;79:363-380.
119. Parker AB, Yusuf S, Naylor CD: The relevance of subgroup-specific treatment effects: the Studies Of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD) revisited. *Am Heart J* 2002;144:941-947.
120. Yusuf S, Pfeffer MA, Swedberg K, Granger CB, Held P, McMurray JJ, Michelson EL, Olofsson B, Ostergren J: Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and preserved left-ventricular ejection fraction: the CHARM-Preserved Trial. *Lancet* 2003;362:777-781.
121. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J: The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 1999;341:709-717.
122. Schmidt AG, Pieske B: [Diastolic heart failure -- therapy]. *Dtsch Med Wochenschr* 2005;130:1213-1216; quiz 1217-1220.
123. Flather MD, Shibata MC, Coats AJ, Van Veldhuisen DJ, Parkhomenko A, Borbola J, Cohen-Solal A, Dumitrascu D, Ferrari R, Lechat P, Soler-Soler J, Tavazzi L, Spinarova L, Toman J, Bohm M, Anker SD, Thompson SG, Poole-Wilson PA: Randomized trial to determine the effect of nebivolol on mortality and cardiovascular hospital admission in elderly patients with heart failure (SENIORS). *Eur Heart J* 2005;26:215-225.
124. Setaro JF, Zaret BL, Schulman DS, Black HR, Soufer R: Usefulness of verapamil for congestive heart failure associated with abnormal left ventricular diastolic filling and normal left ventricular systolic performance. *Am J Cardiol* 1990;66:981-986.
125. Sakata Y, Masuyama T, Yamamoto K, Doi R, Mano T, Kuzuya T, Miwa T, Takeda H, Hori M: Renin angiotensin system-dependent hypertrophy as a contributor to heart failure in hypertensive rats: different characteristics from renin angiotensin system-independent hypertrophy. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:293-299.
126. Klotz S, Hay I, Zhang G, Maurer M, Wang J, Burkhoff D: Development of heart failure in chronic hypertensive Dahl rats: focus on heart failure with preserved ejection fraction. *Hypertension* 2006;47:901-911.
127. Doi R, Masuyama T, Yamamoto K, Doi Y, Mano T, Sakata Y, Ono K, Kuzuya T, Hirota S, Koyama T, Miwa T, Hori M: Development of different phenotypes of hypertensive heart failure: systolic versus diastolic failure in Dahl salt-sensitive rats. *J Hypertens* 2000;18:111-120.
128. Sakata Y, Yamamoto K, Mano T, Nishikawa N, Yoshida J, Hori M, Miwa T, Masuyama T: Activation of matrix metalloproteinases precedes left ventricular remodeling in hypertensive heart failure rats: its inhibition as a primary effect of Angiotensin-converting enzyme inhibitor. *Circulation* 2004;109:2143-2149.
129. Nishio M, Sakata Y, Mano T, Yoshida J, Ohtani T, Takeda Y, Miwa T, Masuyama T, Yamamoto K, Hori M: Therapeutic effects of angiotensin II type 1 receptor blocker at an advanced stage of hypertensive diastolic heart failure. *J Hypertens* 2007;25:455-461.
130. Sasaki K, Heeschen C, Aicher A, Ziebart T, Honold J, Urbich C, Rossig L, Koehl U, Koyanagi M, Mohamed A, Brandes RP, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S: Ex vivo pretreatment of bone marrow mononuclear cells with endothelial NO synthase enhancer AVE9488 enhances their functional activity for cell therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:14537-14541.
131. Rapp JP, Dene H: Development and characteristics of inbred strains of Dahl salt-sensitive and salt-resistant rats. *Hypertension* 1985;7:340-349.

132. Miura N, Suzuki S, Hamada Y, Kamimura R, Fujiki M, Misumi K, Sakamoto H: Salt water promotes hypertension in Dahl-S rats. *Exp Anim* 1999;48:289-292.
133. Snajdar RM, Dene H, Rapp JP: Atrial natriuretic factor in inbred Dahl salt-sensitive and salt-resistant rats. *J Hypertens Suppl* 1986;4:S343-347.
134. Simchon S, Manger WM, Shi GS, Brensilver J: Impaired renal vascular reactivity in prehypertensive Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension* 1992;20:524-532.
135. Bayorh MA, Ogbolu EC, Williams E, Thierry-Palmer M, Sanford G, Emmett N, Harris-Hooker S, Socci RR, Chu TC, Chenault VM: Possible mechanisms of salt-induced hypertension in Dahl salt-sensitive rats. *Physiol Behav* 1998;65:563-568.
136. Rapp JP: Genetic analysis of inherited hypertension in the rat. *Physiol Rev* 2000;80:135-172.
137. Sisson DD, Daniel GB, Twardock AR: Comparison of left ventricular ejection fractions determined in healthy anesthetized dogs by echocardiography and gated equilibrium radionuclide ventriculography. *Am J Vet Res* 1989;50:1840-1847.
138. Whittaker P, Canham PB: Demonstration of quantitative fabric analysis of tendon collagen using two-dimensional polarized light microscopy. *Matrix* 1991;11:56-62.
139. Whittaker P, Kloner RA, Boughner DR, Pickering JG: Quantitative assessment of myocardial collagen with picosirius red staining and circularly polarized light. *Basic Res Cardiol* 1994;89:397-410.
140. Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, Finato N, Beltrami CA, Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P: Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med* 2002;346:5-15.
141. Inoko M, Kihara Y, Morii I, Fujiwara H, Sasayama S: Transition from compensatory hypertrophy to dilated, failing left ventricles in Dahl salt-sensitive rats. *Am J Physiol* 1994;267:H2471-2482.
142. Horinaka S, Kobayashi N, Mori Y, Yagi H, Onoda M, Matsuoka H: Expression of inducible nitric oxide synthase, left ventricular function and remodeling in Dahl salt-sensitive hypertensive rats. *Int J Cardiol* 2003;91:25-35.
143. Murray DR, Prabhu SD, Chandrasekar B: Chronic beta-adrenergic stimulation induces myocardial proinflammatory cytokine expression. *Circulation* 2000;101:2338-2341.
144. Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, Cubicciotti RS, Sageman WS, Lurie K, Billingham ME, Harrison DC, Stinson EB: Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med* 1982;307:205-211.
145. Mortara A, La Rovere MT, Pinna GD, Prpa A, Maestri R, Febo O, Pozzoli M, Opasich C, Tavazzi L: Arterial baroreflex modulation of heart rate in chronic heart failure: clinical and hemodynamic correlates and prognostic implications. *Circulation* 1997;96:3450-3458.
146. Tagawa H, Wang N, Narishige T, Ingber DE, Zile MR, Cooper Gt: Cytoskeletal mechanics in pressure-overload cardiac hypertrophy. *Circ Res* 1997;80:281-289.
147. Fox KM, Bertrand ME, Remme WJ, Ferrari R, Simoons ML, Deckers JW: Efficacy of perindopril in reducing risk of cardiac events in patients with revascularized coronary artery disease. *Am Heart J* 2007;153:629-635.
148. Zhuo JL, Mendelsohn FAO, Ohishi M: Perindopril Alters Vascular Angiotensin-Converting Enzyme, AT1 Receptor, and Nitric Oxide Synthase Expression in Patients With Coronary Heart Disease. *Hypertension* 2002;39:634-638.

149. Massie BM, Carson PE, McMurray JJ, Komajda M, McKelvie R, Zile MR, Anderson S, Donovan M, Iverson E, Staiger C, Ptaszynska A: Irbesartan in patients with heart failure and preserved ejection fraction. *N Engl J Med* 2008;359:2456-2467.
150. Kass DA, Takimoto E, Nagayama T, Champion HC: Phosphodiesterase regulation of nitric oxide signaling. *Cardiovasc Res* 2007;75:303-314.
151. McGown CC, Brookes ZL: Beneficial effects of statins on the microcirculation during sepsis: the role of nitric oxide. *Br J Anaesth* 2007;98:163-175.

5.2. Abkürzungen

ACE	Angiotensin - converting – enzym
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
AVE 3805	Studienmedikament, eNOS - enhancer
A. carotis communis	Arteria communis
BNP	Brain natriuretisches Peptid
CHARM	Candesartan in heart failure – Assessment of reduction in mortality and morbidity
dP/dt max.	Kontraktilität
dP/dt min.	Minimale Druckabfallgeschwindigkeit
EDV	Enddiastolisches Volumen
eNOS	Endotheliale NO – Synthase
EDPVR	Enddiastolische-Druck-Volumen- Beziehung
E/E´	Flussgeschwindigkeit des Blutes durch Gewebeschwindigkeit an der Mitralklappe
E/A	passiver Einstrom des Blutes in den linken Ventrikel / Vorhofkontraktion
Europa	European trial on Reduction of cardiac events with Perindopril in stable coronary Artery disease
HF	Herzfrequenz
HFNEF	Herzinsuffizienz normale Ejektionsfraktion
HFNEFeNOS	Herzinsuffizienz normaler Ejektionsfraktion + Studienmedikament
HMV	Herzminutenvolumen
HW	Herzgewicht
iNOS	Induzierbare - NO Synthase
KON	Kontrollgruppe
KONeNOS	Kontrollgruppe + Studienmedikament
LVEDP	Linksventrikuläre enddiastolischer Druck
LVEF	Linksventrikuläre Auswurfraction
LVESP	Linksventrikulärer endsystolischer Druck

LVH-Index	Linksventrikulärer Hypertrophie Index
M – Mode	Motion - Mode
MMP	Metalloproteasen
NO	Stickstoffmonoxid
NP	Natriuretisches Peptid
p < 0,05	Signifikanz
PCW	Pulmonal-kapillärer Druck
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron System
SAVE	Survival and Ventricular Enlargement
SOLVD	Study of left ventricular dysfunction
SV	Schlagvolumen
TNF – α	Tumor Nekrose Faktor – alpha
V. jugularis	Vena jugularis
2D – mode	Zweidimensionaler Modus

5.3. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	rävalenz HFNEF im Verlauf von 15 Jahren
Abbildung 2	rävalenz HFNEF vs. HFREF
Abbildung 3	aplan-Meier Überlebenskurve HFNEF vs. HFREF
Abbildung 4	ruck-Volumen-Kurve während eines Herzzyklus
Abbildung 5	EDPVR bei Vorlastreduktion
Abbildung 6	stickstoffmonoxid Synthese
Abbildung 7	EDPVR lineare Annäherung
Abbildung 8	EDPVR exponentielle Annäherung
Abbildung 9	\NOS-Genexpression

5.4. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	LVEF - linksventrikuläre Ejektionsfraktion
Tabelle 2	EDV - enddiastolisches Volumen
Tabelle 3	LVH-Index - linksventrikulärer Hypertrophie Index
Tabelle 4	HW - Herzgewicht
Tabelle 5	HF - Herzfrequenz
Tabelle 6	LVESP - linksventrikulärer endsystolischer Druck
Tabelle 7	dP/dt max. - Kontraktilität
Tabelle 8	SV - Schlagvolumen
Tabelle 9	HMV - Herzminutenvolumen
Tabelle 10	dP/dtmin.- minimale Druckabfallgeschwindigkeit
Tabelle 11	LVEDP - linksventrikulärer enddiastolischer Druck
Tabelle 12	Tau – frühe Relaxation
Tabelle 13	EDPVR – enddiastolische Druck-Volumen Beziehung
Tabelle 14	kardiale Fibrose

Erklärung

„Ich, Utz Richter, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: *Eine pharmakologische Stimulierung der endothelialen NO-Synthase führt zu einer Verbesserung der diastolischen Dysfunktion im hypertensiven Dahl-Salz-Rattenmodel*, selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

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

Publikationen

Reduced MMP-2 activity contributes to cardiac fibrosis in experimental diabetic cardiomyopathy.

Van Linthout S, Seeland U, Riad A, Eckhardt O, Hohl M, Dhayat N, **Richter U**, Fischer JW, Böhm M, Pauschinger M, Schultheiss HP, Tschöpe C., Basic Res Cardiol. 2008 Jul;103(4):319-27

Enhancement of the endothelial NO synthase attenuates experimental diastolic heart failure.

Westermann D, Riad A, **Richter U**, Jäger S, Savvatis K, Schuchardt M, Bergmann N, Tölle M, Nagorsen D, Gotthardt M, Schultheiss HP, Tschöpe C., Basic Res Cardiol. 2009

Auszeichnung

Young Investigator Award

Hypertonie 2005 der deutschen Hochdruckliga e.V. DHL
Deutsche Hypertoniegesellschaft, Berlin

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. C. Tschöpe für die Betreuung dieser Doktorarbeit bedanken. Er gab mir die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe erste Erfahrungen in der tierexperimentellen Forschung zu sammeln. In diesem Sinne gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. med. D. Westermann und Herrn Dr. med. A. Riad, die in freundschaftlicher Atmosphäre mein wissenschaftliches Interesse weckten, von denen ich viel lernen konnte, und ich auch außerhalb des Labors gerne an einige erinnerungswürdige Momente denke.

Ebenfalls will ich meinem Bruder danken, der mich überhaupt inspirierte Medizin zu studieren. Zuletzt und am wichtigsten vielen Dank an meine Eltern für ihr gesamtes Wirken und Handeln, und ich freu mich ihnen hiermit sagen zu können, „Ich bin fertig“.