

Aus dem Deutschen Herzzentrum der Charité (CVK)
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Einfluss von BNP und LBQ657 + Valsartan auf die atriale
in-vitro Funktion in humanem Myokard**

Effects of BNP and LBQ657 + Valsartan on Atrial in-vitro
Function in Human Myocardium

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Peter Maximilian Deißler
aus Freiburg im Breisgau

Datum der Promotion: 30.11.2023

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Deissler, P.M.*, Primessnig, U.*, Hohendanner, F., Grubitzsch, H., Falk, V., Pieske, B., Heinzl, F.R., **2019**. Effects of Brain Natriuretic Peptide (BNP) on atrial inotropy and lusitropy: In-vitro assessment in human myocardium, yDZHK Retreat 2019
[Kongressbeitrag, 12.09.2019]

Primessnig, U., **Deissler, P.**, Hohendanner, F., Grubitzsch, H., Falk, V., Pieske, B., Heinzl, F.R., **2019**. BS287 - Effects of Brain Natriuretic Peptide (BNP) on atrial inotropy and lusitropy in human multicellular myocardium. Clin Res Cardiol. 108, Suppl 2. **[Kongressbeitrag, 10.10.2019]**

Deissler, P.M., Primessnig, U., Hohendanner, F., Grubitzsch, H., von Lewinski, D., Falk, V., Pieske, B., Heinzl, F.R., **2020**. P862 - The Effect of Brain Natriuretic Peptide (BNP) on diastolic force adaptation to cardiac stress: In-vitro Assessment in Human Myocardium. Clin Res Cardiol. 109, Suppl 1. **[Kongressbeitrag, Präsentation wegen der COVID-19 Pandemie ausgefallen]**

Wen, Y., **Deißler, P.M.**, Primeßnig, U., Dushe, S., Falk, V., Parwani, A.S., Boldt, L.-H., Blaschke, F., Knosalla, C., Grubitzsch, H., Pieske, B.M., Heinzl, F.R., **2021**. Impaired Relaxation and Reduced Lusitropic Reserve in Atrial Myocardium in the Obese Patients. Front. Cardiovasc. Med. **[27.10.2021, Journal-Publikation]**

Primessnig, U.*, **Deißler, P.M.***, Wakula, P., Tran, K. L., Hohendanner, F., von Lewinski, D., Blaschke, F., Knosalla, C., Falk, V., Pieske, B., Grubitzsch, H., Heinzl, F.R., **2022**. Effects of BNP and Sacubitrilat/Valsartan on atrial functional reserve and arrhythmogenesis in human myocardium. Front. Cardiovasc. Med. **[05.07.2022, Journal-Publikation]**

*geteilte Erstautorenschaft

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	III
II.	Verzeichnisse	VI
II.1	Abkürzungsverzeichnis	VI
II.2	Abbildungsverzeichnis	IX
II.3	Tabellenverzeichnis	XI
III.	Abstracts	XII
III.1	Abstract Deutsch	XII
III.2	Abstract English	XIV
1	Einleitung	1
1.1	Epidemiologie, Diagnostik und Klassifikation der Herzinsuffizienz	1
1.1.1	Definition und Risikofaktoren	1
1.1.2	Symptome und Zeichen	1
1.1.3	Diagnostik und Einteilung	2
1.1.4	Behandlung	3
1.1.5	Morbidität und Mortalität	4
1.2	Die physiologische und pathophysiologische Rolle der Atrien	5
1.2.1	Physiologische Rolle	5
1.2.2	Diagnostische und prognostische Rolle der Atrien	7
1.3	Elektromechanische Kopplung des Herzens	9
1.3.1	Allgemein	9
1.3.2	Atriale Besonderheiten	12
1.4	Vorhofflimmern	14
1.5	Einflussfaktoren der (atrialen) myokardialen Funktion	16
1.5.1	Frank-Starling-Mechanismus und Slow Force Response	17
1.5.2	Kraft-Frequenz-Kopplung	18
1.5.3	Katecholamine (Adrenalin und Noradrenalin)	18
1.5.4	Angiotensin II	20
1.5.5	Endothelin 1 und Bradykinin	21
1.6	Natriuretische Peptide (NPs) und das Nephrylysin-System	22
1.6.1	Allgemein	22
1.6.2	Synthese und Freisetzung von NPs	23
1.6.3	Funktion und Metabolismus von NPs	25
1.6.4	Abbau von NPs	27
1.7	Rolle und Einfluss der ARNs auf Herzinsuffizienz und Arrhythmien	29
1.7.1	Pharmakologische Beeinflussung des NP-Systems	29
1.7.2	Struktur und Pharmakologie von Sacubitril/Valsartan	30
1.7.3	Effekte von Sacubitril/Valsartan auf Herzinsuffizienz und Arrhythmien	31
1.8	Fragestellung der vorliegenden Arbeit	33

2	Methodik	34
2.1	Gewebeproben	34
2.2	Gewebeprotektion.....	35
2.3	Transport und Präparation.....	36
2.4	Allgemeiner Aufbau der Muskelstreifen-Messstationen	38
2.5	Allgemeiner Versuchsablauf.....	42
2.6	Pharmakologische Interventionen und Lösungsmittel.....	44
2.6.1	Isoproterenol (ISO)	44
2.6.2	Humanes BNP	44
2.6.3	Sacubitrilat (LBQ657)	45
2.6.4	Valsartan.....	45
2.7	Übersicht der verwendeten funktionellen Messprotokolle	46
2.7.1	Vorversuch - Frequenzprotokoll	46
2.7.2	Vorversuch - ISO-Konzentrationskurve (Dosis-Wirkungs-Beziehung)	47
2.7.3	Protokoll 1 (Langzeitprotokoll) – ISO ± BNP	48
2.7.4	Protokoll 2 (Frequenzprotokoll) – ISO ± BNP.....	49
2.7.5	Protokoll 3 (Frequenzprotokoll) – ISO ± LBQ657	50
2.7.6	Protokoll 4 (Frequenzprotokoll) – ISO ± LBQ657/Valsartan	51
2.8	Auswertung der Muskelstreifenanalysen.....	52
2.9	Molekularbiologische Untersuchungen	53
2.9.1	Nepriylsin Enzyme-linked Immunosorbent Assay (<i>ELISA</i>).....	54
2.9.2	VASP Western Blot.....	54
2.10	Statistische Analyse	55
3	Ergebnisse.....	56
3.1	Vorversuche.....	56
3.1.1	Frequenzprotokoll.....	56
3.1.2	ISO-Konzentrationskurve	58
3.2	Charakterisierung der Patient:innen	60
3.3	Der Effekt von BNP auf atriale Funktion und Arrhythmogenese – Protokoll 1	63
3.3.1	Zeitabhängige Effekte von BNP auf die entwickelte systolische Kraft	64
3.3.2	Zeitabhängige Effekte von BNP auf die diastolische Spannung	66
3.3.3	Zeitabhängige Effekte von BNP auf die Entstehung von Arrhythmien	67
3.4	Der Effekt von BNP auf atriale Funktion und Arrhythmogenese – Protokoll 2.....	69
3.4.1	Frequenzabhängige Effekte von BNP auf die entwickelte systolische Kraft	70
3.4.2	Frequenzabhängige Effekte von BNP auf die diastolische Spannung.....	71
3.4.3	Frequenzabhängige Effekte von BNP auf die Entstehung von Arrhythmien	72
3.5	Der Effekt von Sacubitrilat (LBQ657) auf atriale Funktion und Arrhythmogenese – Protokoll 3.....	74
3.5.1	Frequenzabhängige Effekte von LBQ657 auf die entwickelte systolische Kraft	76
3.5.2	Frequenzabhängige Effekte von LBQ657 auf die diastolische Spannung	77

3.5.3	Frequenzabhängige Effekte von LBQ657 auf die Entstehung von Arrhythmien.....	78
3.6	Der Effekt von LBQ657 und Valsartan auf atriale Funktion und Arrhythmogenese – Protokoll	
4.	79
3.6.1	Frequenzabhängige Effekte von LBQ657/Valsartan auf die entwickelte systolische Kraft.....	80
3.6.2	Frequenzabhängige Effekte von LBQ657/Valsartan auf die diastolische Spannung....	82
3.6.3	Frequenzabhängige Effekte von LBQ657/Valsartan auf die Entstehung von Arrhythmien	83
3.7	Molekularbiologische Untersuchung der Muskelstreifen und myokardialer Biopsien	86
3.7.1	VASP Phosphorylierung in atrialen Muskelstreifen nach LBQ657/Valsartan-Behandlung.....	86
3.7.2	Nepriylsin-Expression in rechtsatrialen und linksventrikulären Biopsien	87
4	Diskussion	92
4.1	Kurzzusammenfassung der Ergebnisse.....	92
4.2	Inotrope Effekte von BNP und LBQ657 ± Valsartan	94
4.3	Diastolische Spannung und BNP bzw. LQB657 ± Valsartan	99
4.4	Antiarrhythmische Wirkung von BNP und LBQ657 + Valsartan.....	104
4.5	VASP Phosphorylierung	107
4.6	Nepriylsin Expression	109
4.7	Limitationen	111
5	Einordnung der Ergebnisse in den Gesamtkontext, Ausblick und Schlussfolgerung	114
6	Quellenverzeichnis	116
IV.	Eidesstattliche Versicherung	136
V.	Publikationsliste mit Anteilserklärung	137
V.1	Publikationen in Peer-Reviewed Journalen.....	137
V.2	Kongressbeiträge.....	137
VI.	Lebenslauf	139
VII.	Danksagung.....	140
VIII.	Bescheinigung des akkreditierten Statistikers.....	142

II. Verzeichnisse

II.1 Abkürzungsverzeichnis

ACE	<i>Angiotensin Converting Enzym</i>
ANOVA	<i>Analysis of Variance (Varianzanalyse)</i>
ANP	<i>Atriales Natriuretisches Peptid</i>
AR	<i>Adrenorezeptor</i>
ARNI	<i>Angiotensin-Rezeptor-Nepriylisin-Inhibitor</i>
AT1R	<i>Angiotensin-II-Rezeptor Subtyp 1</i>
AT2	<i>Angiotensin II</i>
ATP	<i>Adenosin-Triphosphat</i>
B2 Rezeptor	<i>Bradykinin-Rezeptor Typ 2</i>
BDM	<i>2,3-Butandion-Monoxim</i>
BNP	<i>Brain Natriuretic Peptide, B-Typ Natriuretisches Peptid</i>
cAMP	<i>zyklisches Adenosin-Monophosphat</i>
cGMP	<i>zyklisches Guanosin-Monophosphat</i>
CICR	<i>Calcium induzierte Calcium Freisetzung</i>
CNP	<i>C-Typ Natriuretisches Peptid</i>
CRT	<i>kardiale Resynchronisationstherapie</i>
CUB	<i>Charité – Universitätsmedizin Berlin</i>
DHZB	<i>Deutsches Herzzentrum Berlin</i>
DPP-4	<i>Dipeptidylpeptidase-4</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>
EF	<i>Ejektionsfraktion</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EMK	<i>Elektromechanische Kopplung</i>
ET-1	<i>Endothelin 1</i>
ETA	<i>Endothelin-Rezeptor A</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FSM	<i>Frank-Starling-Mechanismus</i>
FWHM	<i>Full Width at Half Maximum</i>
GJ	<i>Gap Junction</i>
GPCR	<i>G-Protein gekoppelter Rezeptor</i>
GTP	<i>Guanosintriphosphat</i>

HFmrEF	<i>Herzinsuffizienz mit geringgradig/mäßiggradig eingeschränkter Ejektionsfraktion</i>
HFpEF	<i>Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion</i>
HFrEF	<i>Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion</i>
HRT	<i>Half Relaxation Time</i>
HTTP	<i>Half Time to Peak</i>
ICD	<i>implantierbarer Cardioverter-Defibrillator</i>
IDE	<i>Insulysin</i>
IncX	<i>Na⁺/Ca²⁺-Austauscher-Strom</i>
ISO	<i>Isoproterenol</i>
KCCQ	<i>Kansas City Cardiomyopathy Questionnaire</i>
KHK	<i>koronare Herzkrankheit</i>
LA	<i>linksatrial, linkes Atrium</i>
LAVI	<i>linksatrialer Volumenindex</i>
LAEF	<i>linksatriale Ejektionsfraktion</i>
LBQ/LBQ657	<i>Sacubitrilat</i>
L_{max}	<i>Punkt der maximalen Vordehnung der Muskelstreifen</i>
LTCC	<i>L-Typ Calcium-Kanal</i>
LV	<i>linksventrikulär, linker Ventrikel</i>
LVEF	<i>linksventrikuläre Ejektionsfraktion</i>
mM	<i>Millimol/Liter</i>
mN	<i>Millinewton</i>
NCX	<i>Natrium-Calcium-Austauscher</i>
NEP	<i>Neprilysin</i>
NHS	<i>National Health Service</i>
nM	<i>Nanomol/Liter</i>
NP	<i>Natriuretische Peptide</i>
NPPA	<i>Natriuretic Peptide Precursor A</i>
NPPB	<i>Natriuretic Peptide Precursor B</i>
NPR-A	<i>NP Rezeptor Typ A</i>
NPR-B	<i>NP Rezeptor Typ B</i>
NPR-C	<i>NP Rezeptor Typ C</i>
ns	<i>nicht signifikant</i>
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
OR	<i>Odds Ratio</i>

PDE	<i>Phosphodiesterase</i>
PKA	<i>Proteinkinase A</i>
PKG	<i>Proteinkinase G</i>
Plasma-HWZ	<i>Plasma-Halbwertszeit</i>
PVC	<i>premature ventricular contraction (ventrikuläre Extrasystole)</i>
RA	<i>rechtsatrial, rechtes Atrium</i>
RAAS	<i>Renin-Angiotensin-Aldosteron System</i>
RAEF	<i>rechtsatriale Ejektionsfraktion</i>
RAVI	<i>rechtsatrialer Volumenindex</i>
RM	<i>Repeated Measures</i>
RV	<i>rechtsventrikulär, rechter Ventrikel</i>
RyR2	<i>Ryanodin Rezeptor Subtyp 2</i>
Sac/Val	<i>Sacubitril/Valsartan</i>
SEM	<i>Standard Error of Mean (Standardfehler)</i>
SERCA	<i>sarcoplasmic endoplasmic reticulum calcium-transporting ATPase (Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums)</i>
SFR	<i>Slow Force Response</i>
SR	<i>sarkoplasmatisches Retikulum</i>
tau	<i>Relaxationskonstante</i>
TTP	<i>Time to Peak</i>
T-Tubuli	<i>Transversaltubuli</i>
Val	<i>Valsartan</i>
Veh	<i>Vehikel</i>
VHF	<i>Vorhofflimmern</i>

II.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Pathophysiologische und klinische Folgen einer atrialen Dysfunktion bei Herzinsuffizienz	6
Abbildung 1-2: Calciumtransport in ventrikulären Kardiomyozyten	10
Abbildung 1-3: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der T-Tubuli in ventrikulären und atrialen Kardiomyozyten	13
Abbildung 1-4: Transkription, Translation und posttranslationale Modifikation des NPPA und NPPB Gens – Synthese der NPs	24
Abbildung 1-5: Rezeptorsubtypen und Signalwege der NP-Rezeptoren.....	25
Abbildung 2-1: Herzohrprobe vor Präparation der Muskelstreifen.....	35
Abbildung 2-2: Übersichtsabbildung der Messstation im Muskelstreifenlabor	38
Abbildung 2-3: Aufbau und schematische Darstellung einer Muskelstreifen-Messstation	39
Abbildung 2-4: Nahaufnahme eines Muskelstreifenbads mit mechanischem Kraftaufnehmer ..	40
Abbildung 2-5: Nahaufnahme eines Muskelstreifens vor dem Einspannen in den Kraftübertrager auf dem Montageblock in einer BDM-Lösung.....	40
Abbildung 2-6: Darstellung eines typischen Versuchsablaufs mit dem verwendeten MyoTronic System	43
Abbildung 2-7: Schematischer Versuchsablauf des Vorversuchs zur Untersuchung der Frequenzvariation	46
Abbildung 2-8: Schematischer Versuchsablauf des Vorversuchs zur Untersuchung der Dosis-Wirkungs-Beziehung von ISO.....	47
Abbildung 2-9: Schematischer Versuchsablauf des Langzeitprotokolls mit ISO ± BNP.....	48
Abbildung 2-10: Schematischer Versuchsablauf des Frequenzprotokolls mit ISO ± BNP.....	49
Abbildung 2-11: Schematischer Versuchsablauf des Frequenzprotokolls mit ISO ± LBQ657	50
Abbildung 2-12: Schematischer Versuchsablauf des Frequenzprotokolls mit ISO ± LBQ657/Valsartan	51
Abbildung 2-13: Beispielabbildungen für Arrhythmien im Verlauf der Messungen.....	53
Abbildung 3-1: Beispielabbildung für eine Anpassung der Kontraktionskraft an verschiedene Stimulationsfrequenzen	56
Abbildung 3-2: Frequenzabhängigkeit der atrialen in-vitro Funktion.....	57
Abbildung 3-3: Veränderung der Kontraktionskurve eines atrialen Muskelstreifens nach Behandlung mit steigenden ISO-Konzentrationen.....	59

Abbildung 3-4: Veränderung funktioneller Parameter in Reaktion auf ansteigende ISO-Konzentrationen	59
Abbildung 3-5: Beispielabbildungen aus dem Langzeitprotokoll mit ISO ± BNP-Behandlung ...	63
Abbildung 3-6: Relative Kraftzunahme unter ISO ± BNP-Behandlung.....	64
Abbildung 3-7: Änderung atrialer in-vitro Kontraktionsparameter unter ISO vor und 10 min nach Behandlung mit 100 nM BNP	65
Abbildung 3-8: Änderung der diastolischen Spannung unter ISO ± BNP-Behandlung.....	66
Abbildung 3-9: Beispielabbildungen von Arrhythmien im Rahmen des ISO ± BNP-Langzeitprotokolls	67
Abbildung 3-10: Anzahl arrhythmischer Muskelstreifen pro untersuchter Zeitspanne im Langzeitprotokoll unter ISO ± BNP-Behandlung	68
Abbildung 3-11: Beispielabbildungen aus dem Frequenzprotokoll mit ISO ± BNP-Behandlung	69
Abbildung 3-12: Veränderung der entwickelten systolischen Kraft bei Variation der Stimulationsfrequenzen nach Behandlung mit ISO ± BNP	70
Abbildung 3-13: Änderung der diastolischen Spannung unter ISO ± BNP-Behandlung und Frequenzvariation	71
Abbildung 3-14: Beispielabbildungen von Arrhythmien im Rahmen des ISO ± BNP-Frequenzprotokolls.....	72
Abbildung 3-15: Anzahl arrhythmischer Muskelstreifen pro untersuchtem Zeitpunkt im ISO ± BNP-Frequenzprotokoll	73
Abbildung 3-16: Beispielabbildungen aus dem Frequenzprotokoll mit Vehikel (DMSO)- oder LBQ657-Behandlung	75
Abbildung 3-17: Allgemeine und frequenzabhängige Veränderung der entwickelten systolischen Kraft in mit Vehikel (DMSO) oder LBQ657 behandelten Muskelstreifen unter ISO-Behandlung.....	76
Abbildung 3-18: Änderung der diastolischen Spannung unter ISO-Behandlung und Frequenzvariation in mit Vehikel (DMSO) oder LBQ657 behandelten Muskelstreifen.....	77
Abbildung 3-19: Gesamtauswertung der Anzahl arrhythmischer Muskelstreifen pro untersuchtem Zeitpunkt im Frequenzprotokoll mit Vehikel (DMSO)- oder LBQ657-Behandlung	78
Abbildung 3-20: Beispielabbildungen aus dem Frequenzprotokoll mit Vehikel (DMSO)- oder LBQ657/Valsartan-Behandlung	79
Abbildung 3-21: Anpassung der funktionellen Kontraktionsparameter von mit dem Vehikel (DMSO) oder LBQ657/Valsartan behandelten Muskelstreifen vor und nach ISO-Behandlung....	80
Abbildung 3-22: Allgemeine und frequenzabhängige Veränderung der entwickelten systolischen Kraft in mit Vehikel (DMSO) oder LBQ657/Valsartan behandelten Muskelstreifen unter ISO-Behandlung	81

Abbildung 3-23: Effekt von Vehikel (DMSO) oder LBQ657/Valsartan auf die diastolische Spannung.....	82
Abbildung 3-24: Beispielabbildungen von Arrhythmien im Rahmen des LBQ657/Valsartan-Frequenzprotokolls.....	83
Abbildung 3-25: Anzahl arrhythmischer Muskelstreifen pro untersuchtem Zeitpunkt im LBQ657/Valsartan-Frequenzprotokoll.....	84
Abbildung 3-26: VASP-Phosphorylierung an Serin-157 und Serin-239 als Surrogatparameter für die cGMP/PKG-Aktivierung nach Behandlung mit Vehikel (DMSO) oder LBQ657/Valsartan.....	86
Abbildung 3-27: NEP-Expression in rechtsatrialen und linksventrikulären Biopsien von Patient:innen mit terminaler Herzinsuffizienz.....	91
Abbildung 4-1: Zusammenfassung der Ergebnisse der Arbeit.....	93
Abbildung 4-2: Übersicht über relevante Einflussfaktoren auf die diastolische Spannung	100
Abbildung 4-3: Vershobenes Gleichgewicht der Einflussfaktoren auf die diastolische Spannung nach Behandlung mit ISO.....	101
Abbildung 4-4: Einflussfaktoren der Wiederherstellung einer physiologischen Anpassung der diastolischen Spannung durch zusätzliche Behandlung mit BNP.....	103

II.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Verwendete Versuchsmaterialien	38
Tabelle 3-1: Patient:innencharakteristika , -vorerkrankungen und durchgeführte OP-Verfahren	61
Tabelle 3-2: Echokardiographische Funktionsparameter und präoperative Laborparameter.....	62
Tabelle 3-3: Patient:innencharakteristika der NEP-ELISA Kohorte	88
Tabelle 3-4: Echokardiographische Parameter zum Zeitpunkt der Operation der NEP-ELISA Kohorte.....	89

III. Abstracts

III.1 Abstract Deutsch

Hintergrund Das Brain Natriuretic Peptide (*BNP*) gehört zur Gruppe der Natriuretischen Peptide (*NPs*). Am Myokard entfaltet es antifibrotische und antihypertrophe, an der Niere zudem die namensgebenden diuretischen Effekte. Mit dem Angiotensin-Rezeptor-Nepriylsin-Inhibitor (*ARNI*) Sacubitril/Valsartan ist eine Substanz verfügbar, welche den endogenen Abbau der *NPs* vermindert. In Studien führte Sacubitril/Valsartan zu einer deutlichen Reduktion der Morbidität und Mortalität von Patient:innen mit Herzinsuffizienz mit reduzierter Pumpfunktion (*HFrEF*). Obwohl dieser Wirkmechanismus einen neuen Therapieansatz in der *HFrEF*-Behandlung darstellt, ist bisher nur wenig über den direkten Einfluss von *BNP* und *ARNIs* auf die atriale Myokardfunktion und Arrhythmogenese bekannt. In der vorliegenden Arbeit wird aus diesem Grund der Effekt einer *BNP*- und *ARNI*-Therapie auf die atriale funktionelle Reserve und Arrhythmogenese unter β -adrenerger Stimulation (Isoproterenol; *ISO*) *in vitro* untersucht.

Methoden und Ergebnisse Im Rahmen von offenen Herzoperationen wurden $N=42$ Patient:innen atriale Biopsien entnommen, aus welchen $n=101$ Muskelstreifen-Präparate für Kontraktilitätsmessungen gewonnen wurden. Außerdem wurden atriale und ventrikuläre Biopsien von $N=10$ Patient:innen mit terminaler Herzinsuffizienz akquiriert und auf ihre Nepriylsin (*NEP*)-Expression untersucht. *BNP* zeigte keine Kurzzeiteffekte auf die Kraftentwicklung im menschlichen Myokard unter *ISO*-Stimulation, reduzierte jedoch signifikant die diastolische Spannung der Muskelstreifen (*ISO* vs. *ISO* + *BNP*; $p<0,01$) und die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Arrhythmien (Frequenzprotokoll: *ISO* vs. *ISO* + *BNP* insgesamt $p<0,01$). Darüber hinaus korrelierte der Plasma NT-pro*BNP*-Spiegel der Patient:innen signifikant mit dem *ISO*-induzierten Kraftanstieg der Muskelstreifen ($r=0,65$; $p<0,01$). Für die aktive *ARNI*-Wirkstoffkombination LBQ657/Valsartan (*LBQ/VaI*) zeigten sich keine Kurzzeiteffekte auf die kontraktile Funktion. Eine Reduktion arrhythmischer Ereignisse durch *LBQ/VaI*, ähnlich zu *BNP*, wurde jedoch nachgewiesen. Weiterhin zeigten die Analysen, dass *NEP* in humanem atrialen und ventrikulären Myokard gleichermaßen exprimiert wird. Die rechtsatriale *NEP*-Expression korrelierte positiv mit der

rechtsatrialen Auswurfraction ($r=0,806$; $p<0,05$), die linksventrikuläre NEP-Expression korrelierte negativ mit dem linksatrialen Volumen ($r= -0,691$; $p<0,05$).

Schlussfolgerungen BNP bewirkte in humanem atrialen Myokard in-vitro keine kurzfristigen Effekte auf die ISO-vermittelte Inotropie, verringerte aber die diastolische Spannung. Die zunehmend auch in Studien beobachteten antiarrhythmischen Eigenschaften von ARNIs könnten basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit durch eine Verstärkung der parakrinen (B)NP-Wirkung bei LBQ/Val-Behandlung erklärt werden. Zudem scheint die myokardiale NEP-Expression im Rahmen eines kompensatorischen Mechanismus bei HFrEF mit fortschreitender Funktionseinschränkung herabreguliert zu werden.

III.2 Abstract English

Background Brain natriuretic peptide (*BNP*) is one of the central hormones in the natriuretic peptide (*NP*) group. It exerts antifibrotic and antihypertrophic effects on the myocardium and diuretic effects on the kidney (hence the name natriuretic peptides). With the angiotensin receptor-neprilysin inhibitor (*ARNI*) sacubitril/valsartan, a substance is available that reduces the endogenous degradation of NPs. In clinical studies, sacubitril/valsartan led to a significant reduction in morbidity and mortality in patients with heart failure with reduced ejection fraction (*HFrEF*). Although this mechanism of action represents a new therapeutic approach for *HFrEF* treatment, to date only little is known about the direct effects of BNP and ARNIs on atrial myocardial function and arrhythmogenesis. For this reason, the present work investigates the in-vitro effects of BNP and ARNI therapy on atrial functional reserve and arrhythmogenesis under β -adrenergic stimulation (by isoproterenol; *ISO*).

Methods and Results Atrial biopsies were obtained from N=42 patients during open heart surgery, from which n=101 muscle strip preparations were prepared for contractility measurements. In addition, atrial and ventricular biopsies were acquired from another N=10 patients with terminal heart failure and analyzed for neprilysin (*NEP*) expression. BNP exerted no short-term effects on force development in human myocardium under *ISO* stimulation, but significantly reduced diastolic tension of muscle strips (*ISO* vs. *ISO* + *BNP*; $p < 0.01$) and the probability of arrhythmia induction (frequency protocol: *ISO* vs. *ISO* + *BNP*; pooled $p < 0.01$). Furthermore, the patients' plasma NT-proBNP levels significantly correlated with relative *ISO*-induced muscle strip force increase ($r = 0.65$; $p < 0.01$). Similarly to BNP, no short-term effects on contractile function for the pharmacologically active ARNI combination LBQ657/valsartan (*LBQ/VaI*) were observed. However, a reduction of arrhythmic events by *LBQ/VaI*, as seen with BNP, could be demonstrated. Furthermore, analyses revealed that NEP is equally expressed in human atrial and ventricular myocardium. Right atrial NEP expression correlated positively with right atrial ejection fraction ($r = 0.806$; $p < 0.05$), while left ventricular NEP expression correlated negatively with left atrial volume ($r = -0.691$; $p < 0.05$).

Conclusions In-vitro, BNP did not facilitate additional short-term effects on ISO-mediated inotropy in human atrial myocardium, but reduced diastolic tension. The antiarrhythmic properties of ARNIs, which have also increasingly been observed in clinical studies, could be explained by an enhancement of the paracrine (B)NP effect by LBQ/Val treatment based on the results of this thesis. Moreover, myocardial NEP expression seemed to be downregulated as part of a compensatory mechanism in HFrEF in the course of progressive functional impairment.

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie, Diagnostik und Klassifikation der Herzinsuffizienz

1.1.1 Definition und Risikofaktoren

Der Begriff Herzinsuffizienz (*syn. Herzschwäche*) beschreibt ein klinisches Syndrom, welches durch gesteigerte enddiastolische Drücke im Herzen und/oder eine verminderte Auswurfleistung des Herzens in Ruhe oder während körperlicher Belastung verursacht wird. Diese Einschränkungen entstehen auf dem Boden einer strukturellen oder funktionellen kardialen Veränderung, welcher vielfältige Ätiologien zugrunde liegen können (McDonagh et al., 2021; Ponikowski et al., 2016). Insbesondere das Patientenalter, arterielle Hypertonie, Myokardinfarkt, koronare Herzerkrankung, Diabetes Mellitus, linksventrikuläre Hypertrophie, Vorhofflimmern und Klappenvitien sind als Hauptrisikofaktoren der Herzinsuffizienz zu benennen (Mosterd und Hoes, 2007).

Die Rotterdam-Studie, eine prospektive Kohortenstudie mit etwa 8000 Teilnehmer:innen, aus dem Jahr 2004 konnte eindrücklich einen altersabhängigen Anstieg der Prävalenz der Herzinsuffizienz demonstrieren. Während die Punktprävalenz in der Gruppe der 55- bis 64-Jährigen 0,9 % betrug, stieg sie in der Gruppe der 65- bis 74-Jährigen auf 4 % und in der Gruppe der 75- bis 84-Jährigen auf 9,7 % an. In der hochbetagten Gruppe der >85-Jährigen lag die Prävalenz schließlich bei 17,4 % (Bleumink et al., 2004). Insgesamt beträgt die Gesamtprävalenz der Herzinsuffizienz in der Bevölkerung etwa 2 % (Redfield et al., 2003; Roger et al., 2012); im Jahr 2017 waren weltweit 64,3 Mio. Menschen an einer Herzinsuffizienz erkrankt (James et al., 2018) .

1.1.2 Symptome und Zeichen

Im Rahmen einer Herzinsuffizienz kann sich ein Vorwärtsversagen mit vermindertem bzw. inadäquatem Herzzeitvolumen und ein Rückwärtsversagen mit einem systemischen Rückstau des Bluts entwickeln. Die Mehrheit der Symptome und Zeichen einer Herzinsuffizienz lassen sich auf eine dieser beiden Formen des Kreislaufversagens zurückführen (Verbrugge et al., 2020). Zu den typischen Symptomen der Herzinsuffizienz gehören insbesondere Atemlosigkeit, verminderte

1 Einleitung

Ausdauer, Fatigue und Knöchelödeme. Die klinischen Zeichen umfassen beispielsweise einen erhöhten Jugularvenendruck mit sichtbar gestauten Jugularvenen, einen dritten Herzton und eine Lateralverschiebung des Herzspitzenstoßes (McDonagh et al., 2021; Mosterd und Hoes, 2007).

1.1.3 Diagnostik und Einteilung

Der aktuelle diagnostische Algorithmus zur Diagnose einer Herzinsuffizienz der ESC Leitlinie aus dem Jahr 2021 beginnt mit der Feststellung eines Herzinsuffizienz-Verdachts bei Patient:innen. Grundlage dieses Verdachts sind die anamnestische Identifikation von vorhandenen Risikofaktoren einer Herzinsuffizienz, Symptome oder Zeichen einer Herzinsuffizienz in der körperlichen Untersuchung und abnormale EKG-Befunde. In einem nächsten Schritt wird die Diagnose durch die Messung der NT-pro BNP- oder BNP-Konzentration im Plasma und eine echokardiographische Untersuchung verifiziert. Erhöhte (NT-pro) BNP-Spiegel und abnormale Befunde in der Echokardiographie sprechen für das Vorliegen einer Herzinsuffizienz, welche anhand der gemessenen linksventrikulären Ejektionsfraktion (*LVEF*) in drei verschiedene Herzinsuffizienz-Phänotypen eingeteilt werden kann. Bei diesen handelt es sich um die Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion (*HFpEF*), mit geringgradig/mäßiggradig reduzierter Ejektionsfraktion (*HFmrEF*) und mit reduzierter Ejektionsfraktion (*HFrfEF*) (McDonagh et al., 2021).

Eine *HFpEF* ist durch das Vorliegen von Symptomen und Zeichen einer Herzinsuffizienz bei einer *LVEF* ≥ 50 % und dem Nachweis einer relevanten strukturellen oder funktionellen Veränderung des Herzens definiert. Die vorliegenden Veränderungen des Herzens sollen dabei mit einer diastolischen Dysfunktion oder erhöhten Füllungsdrücken des linken Ventrikels vereinbar sein. Die Definition einer *HFmrEF* und einer *HFrfEF* basiert hingegen rein auf dem Vorliegen der klinischen Symptome und Zeichen einer Herzinsuffizienz, sowie einer mäßiggradig reduzierten *EF* bei der *HFmrEF* (*LVEF* 41-49 %) oder einer reduzierten *EF* bei der *HFrfEF* (*LVEF* ≤ 40 %) (McDonagh et al., 2021).

1.1.4 Behandlung

Zur Behandlung der Herzinsuffizienz stehen medikamentöse und interventionelle Strategien zur Verfügung, für welche in der Gruppe der Patient:innen mit HFrEF in Studien eine gute Wirksamkeit und Evidenz nachgewiesen werden konnten. Die Therapie der HFrEF fußt auf der (kombinierten) Behandlung mit ACE-Hemmern/AT₁-Blockern/ARNIs, β -Blockern, Mineralokortikoidrezeptor-Antagonisten und SGLT2-Inhibitoren. Im Falle einer Volumenüberladung können zudem Diuretika zur Symptomkontrolle verwendet werden. Falls diese pharmakologische Therapie nicht ausreicht, kann in einem weiteren Schritt bei geeigneten Patient:innen eine kardiale Resynchronisationstherapie (CRT) oder ein implantierbarer Cardioverter-Defibrillator (ICD) zur Senkung der Mortalität eingesetzt werden. Eine CRT hat zudem positive Effekte auf die Morbidität und die Lebensqualität der Patient:innen. Im Falle einer terminalen Herzinsuffizienz stehen schließlich bei einigen Patient:innen die Behandlung mit einem linksventrikulären Assist Device (LVAD) oder einer Herztransplantation zur Verfügung (McDonagh et al., 2021).

Für die Gruppe der Patient:innen mit HFmrEF ist aufgrund der schlechten Datenlage keine klare Empfehlung für eine medikamentöse Behandlung außer einer diuretischen Therapie möglich. Eine Behandlung mit den zuvor genannten Medikamenten zur HFrEF-Behandlung kann jedoch erwogen werden. Viele der klassischen medikamentösen HFrEF-Therapien zeigen auch in der HFpEF-Behandlung keine Wirkung, weswegen neben der Behandlung anderer Grunderkrankungen nur die Behandlung mit Diuretika empfohlen wird (McDonagh et al., 2021). Die im Jahr 2021 publizierte EMPEROR-PRESERVED-Studie zeigt jedoch, dass eine Behandlung mit dem SGLT2-Hemmer Empagliflozin das kombinierte Risiko eines kardiovaskulären Todes oder einer Herzinsuffizienz-Hospitalisierung bei Patient:innen mit Herzinsuffizienz und einer LVEF >40 % um 21 % gegenüber einem Placebo vermindert (Anker et al., 2021). Ein ähnlicher Effekt konnte ebenfalls in der 2022 veröffentlichten DELIVER-Studie für Dapagliflozin gezeigt werden (Solomon et al., 2022). Eine sehr zeitnahe Anwendung der SGLT2-Inhibitoren Empagliflozin und Dapagliflozin zur diabetes-unabhängigen HFmrEF- und HFpEF-Behandlung ist also anzunehmen.

Die Klassifikation der Symptomschwere und der körperlichen Einschränkung durch die Herzinsuffizienz wird klinisch häufig anhand der anamnestischen New York Heart Association (NYHA) Einteilung von Grad I-IV erzielt. Während Grad I eine Erkrankung

1 Einleitung

ohne Einschränkung der körperlichen Aktivität beschreibt, handelt es sich bei Grad IV um eine Einschränkung schon in Ruhe bei absoluter Belastungsintoleranz (McDonagh et al., 2021). Problematisch an dieser Einteilung ist jedoch, dass sie trotz der weit verbreiteten Nutzung nur bedingt reproduzierbar ist (Raphael et al., 2007; Yap et al., 2015). Durch Fragebögen wie dem Kansas City Cardiomyopathy Questionnaire (KCCQ) kann die Symptomschwere hingegen zu einem höheren Grad objektiviert werden (Green et al., 2000; Spertus et al., 2020).

1.1.5 Morbidität und Mortalität

Während in der Rotterdam-Studie aus dem Jahr 2004 eine Mortalität von 37 % im ersten Jahr nach Diagnose der Herzinsuffizienz und 65 % in den ersten fünf Jahren berichtet wird (Bleumink et al., 2004), wird in der ESC-HF Pilot Studie aus dem Jahr 2013 eine Ein-Jahres-Mortalität von 17,4 % bei Patient:innen mit akuter, neu aufgetretener Herzinsuffizienz und von 7,2 % bei Patient:innen mit chronischer Herzinsuffizienz gezeigt, was jedoch zum Teil auf methodische Unterschiede zurückgeführt werden kann (Maggioni et al., 2013). Insgesamt ist in den letzten Jahrzehnten eine deutliche Verbesserung des Patientenüberlebens und ein deutlicher Rückgang der Hospitalisierungsrate erreicht worden, was unter anderem durch verbesserte präventive und pharmakologische Ansätze zu erklären ist (Jhund et al., 2009; Maggioni et al., 2013). Trotz dieser insgesamt positiven Entwicklung ist die Herzinsuffizienz weiterhin eine enorme soziale und ökonomische Bürde: Männer und Frauen im Alter von 55 Jahren haben weiterhin ein Lebenszeitrisiko von 33 % bzw. 29 % an einer Herzinsuffizienz zu erkranken (Bleumink et al., 2004) und etwa 11 % der in den USA ausgestellten Totenscheine umfassen auch die Diagnose Herzinsuffizienz (Roger et al., 2012). Außerdem ist jede Herzinsuffizienz-Erkrankung durchschnittlich mit einem Verlust von fast 10 Lebensjahren pro Patient:in verbunden (Harshali et al., 2015) und eine Studie aus dem Vereinigten Königreich legt nahe, dass alleine die Herzinsuffizienzbehandlung etwa 2 % des gesamten Budgets des NHS umfasst (Stewart et al., 2002).

Auf Grund all dieser Faktoren sind neue und gezieltere Therapien sowie ein vertieftes pathophysiologisches Verständnis der Herzinsuffizienz hochrelevant.

1.2 Die physiologische und pathophysiologische Rolle der Atrien

1.2.1 Physiologische Rolle

Das rechte und linke Atrium bilden das Bindeglied zwischen systemischem bzw. pulmonal-venösem Rückfluss und den Ventrikeln des Herzens (Goette et al., 2017). Normalisiert auf die Körperoberfläche des Menschen sind ein linksatrialer Volumenindex von 22,6 mL/m² (Hoit, 2014) und ein rechtsatrialer Volumenindex von 19,4 mL/m² (Soulat-dufour et al., 2020) als physiologisch zu erachten. Während das linksatriale Volumen nach Korrektur auf die Körperoberfläche nicht geschlechtsabhängig ist (Spencer et al., 2001), zeigt sich auch nach Korrektur auf die Körperoberfläche ein größeres rechtes Atrium bei Männern (Soulat-dufour et al., 2020).

Das linke Atrium (*LA*) erfüllt seine Rolle als Modulator der linksventrikulären (*LV*, auch linker Ventrikel) Füllung, indem es in der LV Systole als Reservoir für das aus dem Lungenkreislauf zurücktransportierte Blut fungiert. In der LV Diastole lässt sich die LA Funktion in zwei weitere Phasen unterteilen: Während der Conduit-Phase in der frühen LV Diastole wird das aus der Lunge zurückkehrende Blut passiv in den LV weitergeleitet. In der späten ventrikulären Diastole wird das Blut schließlich im Rahmen der aktiven atrialen Kontraktion in den LV transportiert. Diese Phase wird auch als Boosterpumpen-Phase bezeichnet (Goette et al., 2017; Hoit, 2014; Rahimtoola et al., 1975). Ein ähnlicher Ablauf kann auch im rechten Atrium (*RA*) festgestellt werden (Rai et al., 2015; Soulat-dufour et al., 2020). Dabei trägt die Kontraktion des RA bis zu 30 % zum rechtsventrikulären Schlagvolumen bei (Rai et al., 2015).

Der Beitrag der Atrien an der ventrikulären Füllung wird insbesondere in Situationen mit eingeschränkter ventrikulärer Funktion deutlich: Bei Patient:innen mit Myokardinfarkt und eingeschränkter Ejektionsfraktion (*EF*) konnte gezeigt werden, dass die LA Kontraktion (unter Ausschöpfung der funktionellen Reserve des LA) zu mehr als einem Drittel zum ventrikulären Schlagvolumen und zu fast 40 % zum enddiastolischen LV Druck beitrug (Rahimtoola et al., 1975). Auch in einer weiteren Studie wurde nachgewiesen, dass der Anteil der aktiven LA Kontraktion am LV Schlagvolumen bei Patient:innen mit Myokardinfarkt mit 42 % am gesamten Schlagvolumen deutlich erhöht war (Matsuda et al., 1983).

1 Einleitung

Da zentrale Anteile des erregungsbildenden Systems im oberen RA lokalisiert sind, spielt dieses weiterhin auch eine Rolle in der kardialen Erregungsbildung und Chronotropie. Außerdem sind die Atrien durch die dehnungsabhängige Freisetzung natriuretischer Peptide als endokrines Organ wirksam (Goette et al., 2017; Hohendanner et al., 2018).

In Situationen mit eingeschränkter atrialer Funktion wird die physiologische Rolle der Atrien besonders deutlich. Eine entsprechende Übersicht findet sich in Abbildung 1-1.

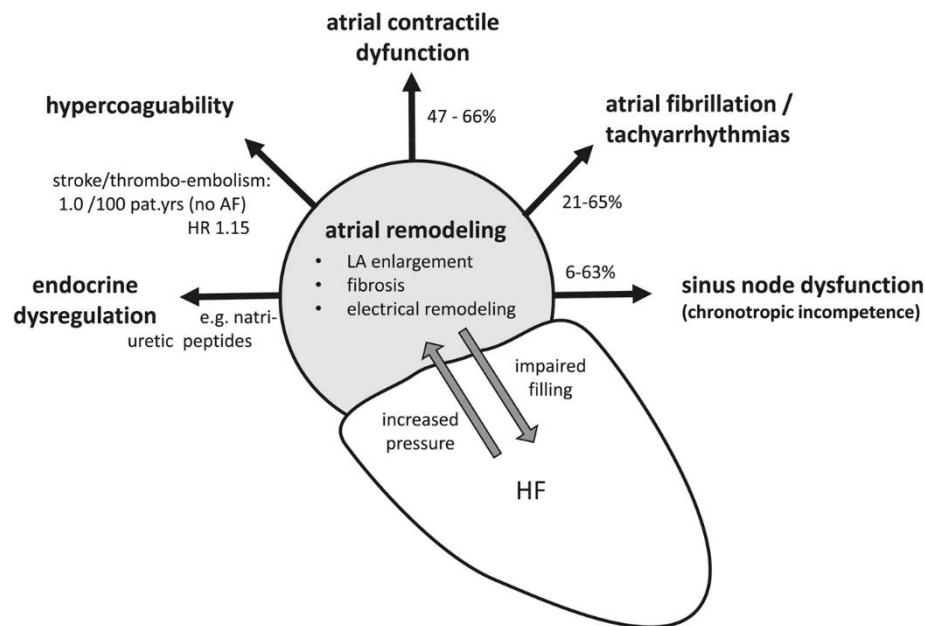


Abbildung 1-1: Pathophysiologische und klinische Folgen einer atrialen Dysfunktion bei Herzinsuffizienz

LA: linksatrial, HF: Herzinsuffizienz (modifiziert aus Abbildung 1 in Hohendanner, F., Messroghli, D., Bode, D., Blaschke, F., Parwani, A., Boldt, L.H., Heinzel, F.R., 2018. Atrial remodeling in heart failure: recent developments and relevance for heart failure with preserved ejection fraction. *ESC Hear. Fail.* 5, 211-221, doi:10.1002/ehf2.12260; Lizenznummer: 5423520109265)

Aufgrund ihres relevanten Beitrags zur ventrikulären Füllung und Funktion ist die atriale Funktion eng mit einer Herzinsuffizienz verknüpft. Der gesteigerte Anteil der Atrien an der ventrikulären Füllung in Situationen mit eingeschränkter ventrikulärer Funktion zeigt deutlich, dass eine Teilkompensation der ventrikulären Einschränkung über den gesteigerten atrialen Anteil an der EF möglich ist. Insbesondere durch Patient:innen mit gleichzeitig auftretender Herzinsuffizienz und Vorhofflimmern wird unterstrichen, dass der atriale Beitrag an der LV Funktion essentiell für die Aufrechterhaltung der Auswurfleistung ist: Eine Wiederherstellung der regelrechten Funktion des Atriums durch eine Ablation des Vorhofflimmerns ist mit einer Zunahme der LVEF (von im Durchschnitt 15 %) assoziiert (Anter et al., 2009). Die pharmakologische oder endokrine Modulation der atrialen Funktion und atrialen

funktionellen Reserve im Rahmen einer ventrikulären Dysfunktion kann aus diesem Grund einen wertvollen Beitrag zu einer verbesserten Auswurfleistung und Funktion des Ventrikels leisten.

1.2.2 Diagnostische und prognostische Rolle der Atrien

Aufgrund ihres Einflusses auf die kardiale Funktion kann die Untersuchung der atrialen Funktion auch als diagnostisches oder prognostisches Kriterium herangezogen werden. Der linksatriale Volumenindex (*LAVI*) ist ein unabhängiger Prädiktor kardiovaskulärer Ereignisse (u.a. Vorhofflimmern, Herzinsuffizienz, Myokardinfarkt und Schlaganfall) (Tsang et al., 2003).

Patient:innen mit chronischer Herzinsuffizienz weisen in etwa 50 % der Fälle eine Vergrößerung des LA auf (Hohendanner et al., 2018). Je nach Herzinsuffizienz-Phänotyp (siehe 1.1.3) lassen sich zudem unterschiedliche Veränderungen am linken Atrium feststellen: Eine HFrEF ist eher mit einem exzentrischen atrialen Remodelling und systolischer atrialer Dysfunktion assoziiert, während bei HFpEF eher eine Erhöhung der atrialen Steifheit und eine erhöhte atriale Druckpulsatilität zu messen ist (Melenovsky et al., 2015). In kardialen MRT Untersuchungen konnte zudem gezeigt werden, dass Patient:innen mit neu aufgetretener Herzinsuffizienz bereits vor dem Auftreten erster Symptome eine Verminderung des Peak Longitudinal Strains im LA und einen erhöhten minimalen *LAVI* zeigen (Habibi et al., 2014).

Ein erhöhter *LAVI*, vor allem in Kombination mit einer verminderten linksatrialen Ejektionsfraktion (*LAEF*), ist außerdem als Risikofaktor für das Neuauftreten von Vorhofflimmern bzw. Vorhofflattern beschrieben worden (Abhayaratna et al., 2008). Zudem sind die Erfolgsaussichten einer Kardioversion bzw. einer Ablation eines bestehenden Vorhofflimmerns ebenfalls mit der atrialen Funktion (gemessen durch den atrialen Strain sowie die atriale Strain Rate) assoziiert. Höhere Werte beider Parameter sind durch einen deutlich höheren Langzeitbehandlungserfolg nach der jeweiligen Intervention gekennzeichnet (Salvo et al., 2005; Schneider et al., 2008).

Neben LA Veränderungen sind auch RA Volumenveränderungen von diagnostischer Relevanz. Es konnte gezeigt werden, dass der echokardiographisch bestimmte rechtsatriale Volumenindex (*RAVI*) bei der Vorhersage eines Wiederauftretens von

1 Einleitung

Vorhofflimmern sechs Monate nach Kardioversion dem links- und biatrialen Volumenindex überlegen war (Luong et al., 2015). Zudem korreliert der RAVI signifikant mit der systolischen rechtsventrikulären Funktion und kann somit als Parameter für die systolische rechtsventrikuläre Dysfunktion bei Patient:innen mit chronischer Herzinsuffizienz angesehen werden (Sallach et al., 2009).

Trotz des zuvor beschriebenen Zusammenhangs zwischen atrialer Funktion und ventrikulärer Auswurfleistung ist der Einfluss einer Herzinsuffizienz-Pharmakotherapie auf die Verbesserung der atrialen Funktion bisher nur in wenigen Studien mit geringer Stichprobengröße untersucht worden. In einer Studie an hypertensiven Patient:innen konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine Inhibition des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems (RAAS) durch ACE-Hemmer und AT2-Blocker zu einer Verbesserung der kontraktilen Funktion des LA (gemessen als LA Strain und Strain Rate) führt (Dimitroula et al., 2010). Bei Patient:innen nach Myokardinfarkt wurde zudem eine Verbesserung der LA EF (um 4 %) durch Spironolacton nachgewiesen (Kayrak et al., 2010). Eine Therapie mit β -Blockern hingegen führte in einer Studie von Sardana et al. bei Patient:innen mit Hypertonus zu einer Einschränkung der LA Funktion in allen Phasen des atrialen Kontraktionszyklus (Sardana et al., 2017). In einer Gruppe von Patient:innen mit Vorhofflimmern wurde die Wirkung von Sacubitril/Valsartan auf die LA Funktion untersucht. Im Vergleich zu einer reinen RAAS-Inhibition führte die ARNI-Therapie zu einer Erhöhung der LAEF und dem LA peak systolic strain (Suo et al., 2019).

Aufgrund der zentralen Rolle der Atrien bei der Aufrechterhaltung der ventrikulären Funktion und ihrer großen Rolle als prognostischer Parameter müssen pharmakologische und endokrine Mechanismen zur Funktionsverbesserung der Atrien dringend in zukünftigen Studien detailliert untersucht werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll in diesem Kontext insbesondere untersucht werden, inwieweit ARNIs in-vitro akute Effekte auf die atriale funktionelle Reserve (mit Fokus auf Inotropie und Lusitropie) entfalten, und ob diese Effekte durch die direkte Erhöhung der Gewebskonzentration des B-Typ Natriuretischen Peptids erklärt werden können.

1.3 Elektromechanische Kopplung des Herzens

1.3.1 Allgemein

Der Begriff elektromechanische Kopplung (*EMK*) beschreibt die Umsetzung eines elektrischen Stimulus in eine mechanische Reaktion in Kardiomyozyten und anderen kontraktile Zellen. Die EMK bildet somit die Grundlage der Initiation der mechanischen Kontraktion des Herzens. Für diesen Prozess ist insbesondere die Veränderung der zytosolischen Ca^{2+} -Spiegel von großer Bedeutung (Bers, 2002; Gambardella et al., 2018).

Durch die rhythmische und spontane Depolarisation des Sinusknotens, welcher im oberen Teil des RA in der Nähe der Mündung der Vena Cava Superior lokalisiert ist, wird die atriale und ventrikuläre Kontraktion im Sinusrhythmus eingeleitet. Ausgehend von seiner Lokalisation im rechten Vorhof breitet sich das elektrische Signal dann entlang des spezifischen Leitungssystems des Herzens auf die Atrien und Ventrikel aus (Choudhury et al., 2015; Kashou et al., 2021). Die endständige, lokale Erregungsförderung zwischen einzelnen Kardiomyozyten ist schließlich stark von der Verbindung der Zellen durch Gap Junctions (*GJ*) abhängig. Die GJ werden von Transmembranproteinen, den Connexinen, gebildet, wobei besonders Connexin 43 im adulten, humanen Myokard vorherrschend exprimiert ist (Gros und Jongsma, 1996). Durch die enge Verbindung der einzelnen Kardiomyozyten durch GJ entsteht ein funktionelles Synzytium, welches eine geregelte Kontraktion des Herzens ermöglicht.

Das sich entlang der Zellmembran (Sarkolemm) der Kardiomyozyten ausbreitende Aktionspotential trifft während der Fortleitung auf die Transversal-Tubuli (*T-Tubuli*), welche spezialisierte Einstülpungen der Zellmembran darstellen und sich tief in den intrazellulären Raum der Kardiomyozyten erstrecken. Die T-Tubuli sind insbesondere entlang der Z-Scheiben der Myofilamente angeordnet und befinden sich in direkter räumlicher Nähe zu den terminalen Zisternen des sarkoplasmatischen Retikulums (*SR*), welche den intrazellulären Speicherort von Ca^{2+} -Ionen darstellen (Gambardella et al., 2018; Hong und Shaw, 2017). Aufgrund der engen räumlichen Anordnung von T-Tubuli und terminalen Zisternen und ihrem funktionellem Zusammenspiel wird der Verbund beider Organellen in Kardiomyozyten als Dyade bezeichnet (Hong und Shaw, 2017). Abbildung 1-2 zeigt die zugehörige schematische Übersicht.

1 Einleitung

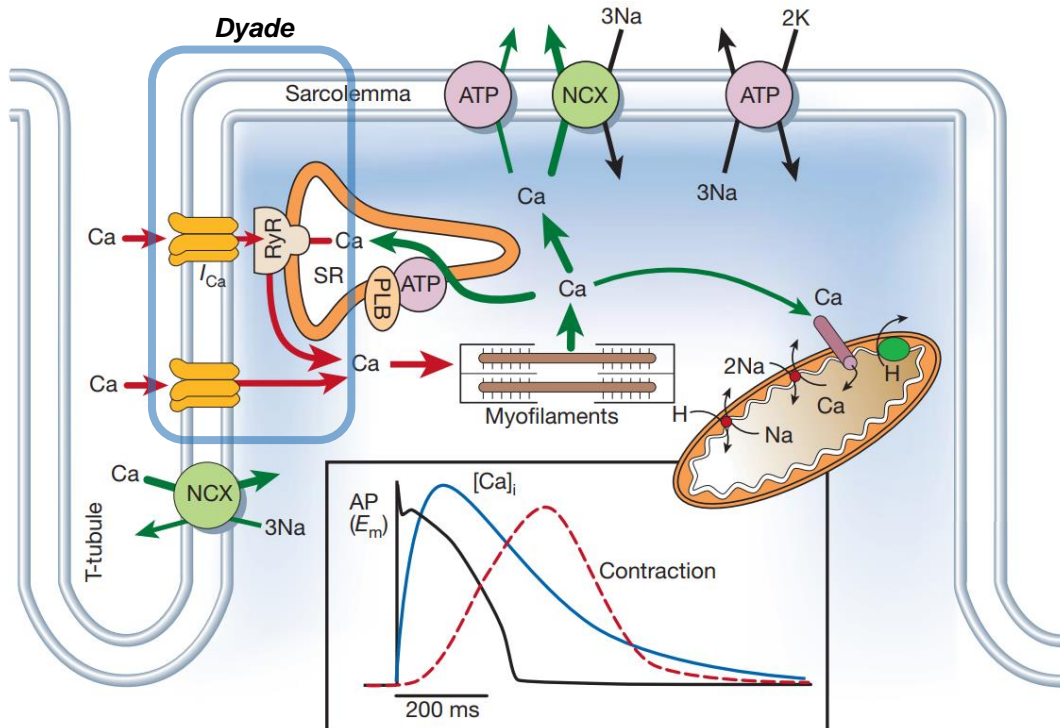


Abbildung 1-2: Calciumtransport in ventrikulären Kardiomyozyten

Ca: Calcium; Na: Natrium; K: Kalium; H: Wasserstoff; NCX: Natrium-Calcium-Austauscher; ATP: ATPase; PLB: Phospholamban; SR: sarkoplasmatisches Retikulum; RyR: Ryanodin Rezeptor; I_{Ca} : Ca^{2+} -Einwärtsstrom, AP: Aktionspotential, $[Ca]_i$: intrazelluläres Calcium (modifiziert aus Abbildung 1 in Bers DM. *Cardiac excitation–contraction coupling*. *Nature*. 2002;415(6868):198-205. doi:10.1038/415198a; Lizenznummer: 5185900258373)

An der Dyade spielt sich mit der Calcium-induzierten Calciumfreisetzung (CICR) einer der zentralen Schritte der Umwandlung des Aktionspotentials in eine mechanische Kontraktion ab. Im Rahmen der CICR wird durch den Einstrom einer geringen Menge Ca^{2+} -Ionen von extrazellulär nach intrazellulär die Freisetzung einer größeren Menge Ca^{2+} -Ionen aus dem intrazellulären SR eingeleitet (Fabiato, 1983; Fabiato und Fabiato, 1979, 1975). Im Detail laufen folgende Prozesse ab: Die durch das Aktionspotential bedingte Depolarisation des Sarkolemm bewirkt eine Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit der auf den T-Tubuli lokalisierten, spannungsgesteuerten L-Typ Calcium-Kanälen (LTCC) vor allem während der Plateauphase des kardialen Aktionspotentials, wodurch es zum Einstrom einer geringen Menge Ca^{2+} -Ionen in die Zelle kommt (Bers und Perez-Reyes, 1999; Fabiato und Fabiato, 1979). Diese Ca^{2+} -Ionen binden intrazellulär an den im Myokard vorherrschenden Subtyp 2 des Ryanodin Rezeptors (RyR2), welcher am SR lokalisiert ist, was die Freisetzung einer größeren Menge Ca^{2+} -Ionen aus dem SR in das Zytosol bewirkt (Bers und Perez-Reyes, 1999; Nakai et al., 1997) (Abbildung 1-2). Diese Potenzierung der Calciumfreisetzung aus

1 Einleitung

dem SR lässt sich unter anderem dadurch erklären, dass die von jedem LTCC freigesetzten Ca^{2+} -Ionen 4-6 RyR2 aktivieren können, welche sich meist in direkter Nähe des LTCC befinden (Wang et al., 2001). Insgesamt kommt es so zu einer rapiden Erhöhung des zytoplasmatischen Calciumgehalts von 100 nM auf 1-10 μM (Evenäs et al., 1998; Marks, 2003).

Diese zytoplasmatischen Ca^{2+} -Ionen binden in einem nächsten Schritt an Troponin C, welches die Calcium-bindende Untereinheit des Troponin-Komplexes darstellt. Der Troponin-Komplex besteht insgesamt aus drei funktionellen Untereinheiten: Troponin C (der Calcium-bindenden Untereinheit), Troponin I (der inhibitorischen Untereinheit) und Troponin T (der Tropomyosin-bindenden Untereinheit) (Cheng and Regnier, 2016). Bei Tropomyosin handelt es sich um ein Regulatorprotein, welches bei geringen intrazellulären Calcium-Konzentrationen vom Troponin-Komplex so positioniert wird, dass es die Bindung des Myosin-Köpfchens an die Aktinbindungsstellen sterisch blockiert (de Tombe, 2003; Gambardella et al., 2018).

Die Calcium-Bindung an Troponin C induziert eine Konformationsänderung des gesamten Troponinkomplexes, was eine Veränderung der Position von Tropomyosin und so eine Freilegung der Myosin-Bindungsstellen auf dem Protein Aktin bewirkt (Cheng und Regnier, 2016; Gambardella et al., 2018; Hanft et al., 2008). Dadurch ist im Folgenden die Interaktion zwischen Aktin und Myosin möglich, welche die Basis des Querbrückenzyklus ist. Durch die vielfache Wiederholung dieses Zyklus, der auf der Abscherung der Myosin-Köpfchen unter Adenosin-Triphosphat (ATP)-Verbrauch entlang des Aktins und dem Aufbau einer neuen Bindung beruht, gleiten die Myofilamente übereinander (de Tombe, 2003; Gambardella et al., 2018). Dies führt in der Summe zu einer Verkürzung der einzelnen Muskelzelle und zu einer Kontraktion des Myokards.

Um nach dem Ende der Systole eine Relaxation der Muskelzellen zu ermöglichen, muss die Konzentration der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Ionen wieder auf die Ausgangskonzentration von etwa 100 nM reduziert werden. Die Calcium-Pumpe *SERCA* (Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums) entfernt etwa 70 % der Ca^{2+} -Ionen aus dem Zytoplasma und transportiert sie unter ATP-Verbrauch wieder zurück in das SR, wo sie für den nächsten Zyklus der CICR zur Verfügung stehen. Weitere 28 % der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Ionen werden

1 Einleitung

durch den Natrium-Calcium-Austauscher (*NCX*) in den Extrazellularraum transportiert. Dabei werden drei Natrium-Ionen gegen ein Ca^{2+} -Ion ausgetauscht (Bers, 2006, 2002). Die verbleibenden 2 % werden zu etwa gleichen Teilen durch langsamere Transporter aus dem Zytoplasma entfernt: Es handelt sich dabei um die sarkolemmale Calcium-ATPase, welche Ca^{2+} -Ionen unter ATP-Verbrauch in den Extrazellularraum transportiert und den mitochondrialen Calcium-Uniporter, welcher Ca^{2+} -Ionen in die Mitochondrien verschiebt (Bers, 2006, 2002) (siehe Abbildung 1-2).

1.3.2 Atriale Besonderheiten

Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit atriale Myokardbiopsien untersucht wurden, werden im Folgenden einige zelluläre und funktionelle Besonderheiten des atrialen Myokards dargelegt. Funktionell ist die Kontraktions- und Relaxationszeit atrialer Kardiomyozyten im Vergleich zum Ventrikel deutlich verkürzt (Bootman et al., 2006; Goette et al., 2017). Zudem zeigt atriales Myokard eine geringere Kraftentwicklung als der Ventrikel; ein kürzere Calcium-Transienten-Dauer im Atrium ist ebenfalls in der Literatur beschrieben (Bootman et al., 2006; Goette et al., 2017). Die Expression der SERCA2a im atrialen Myokard ist um etwa den Faktor zwei gegenüber dem Ventrikel erhöht; zusätzlich dazu ist der SERCA-Inhibitor Phospholamban weniger stark im Atrium als im Ventrikel exprimiert. Dies erklärt die im Vergleich zum ventrikulären Myokard insgesamt deutlich erhöhte Aktivität der SERCA2a im Atrium (Blatter et al., 2021; Goette et al., 2017). Im atrialen Myokard ist weiterhin die Expression der Einwärtsgleichrichter-Kalium-Spannung (I_{K1}) im Vergleich zum Ventrikel vermindert, was unter anderem das weniger negative Ruhemembranpotential und die langsamere Repolarisation in der Phase 3 des Aktionspotentials im Atrium erklärt (Blatter et al., 2021; Goette et al., 2017). Außerdem ist in atrialen Kardiomyozyten neben Connexin-43 (im Ventrikel fast ausschließlich exprimiert) auch Connexin-40 stark in die Zell-Zell-Kontakte involviert (Blatter et al., 2021; Goette et al., 2017).

1 Einleitung

Einer der größten Unterschiede zwischen atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten ist die Struktur des T-Tubuli-Systems. Während ventrikuläre Kardiomyozyten über ein ausgeprägtes, symmetrisches T-Tubuli-Raster verfügen, sind die T-Tubuli in den Atrien deutlich geringer und asymmetrischer ausgeprägt (siehe Abbildung 1-3) (Blatter et al., 2021). Dies hat zur Folge, dass die Calcium-Freisetzung in atrialen Kardiomyozyten lokal sehr heterogen und variabel ist. Die Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration in den Atrien kann durch das Fehlen von T-Tubuli vorwiegend nur oberflächennah in der Peripherie der Zelle durch den LTCC initiiert werden. Folglich kommt es zu einer zentripetalen (einer von peripher nach zentral ablaufenden) Freisetzung von Calcium, welche auf einer Diffusion des Calciums in das Zentrum der Zelle mit einer RyR2-vermittelten CICR in zunehmend zentraleren Regionen der Zelle beruht (Blatter et al., 2021; Bootman et al., 2006; Goette et al., 2017). Diese intrazelluläre Fortleitung des Calcium-Signals ist schließlich auch die Basis der zuvor beschriebenen Heterogenität der intrazellulären Calcium-Freisetzung und erklärt das Entstehen von intrazellulären Calcium-Gradienten in atrialen Kardiomyozyten (Blatter et al., 2021; Bootman et al., 2006; Goette et al., 2017). Da aufgrund des weitgehenden Fehlens der T-Tubuli nur in den peripheren Regionen der atrialen Kardiomyozyten eine ausreichende Dichte des NXC vorliegt, beruht die überwiegende Mehrheit der intrazellulären Calcium-Elimination folglich auf der SERCA2a (Blatter et al., 2021).

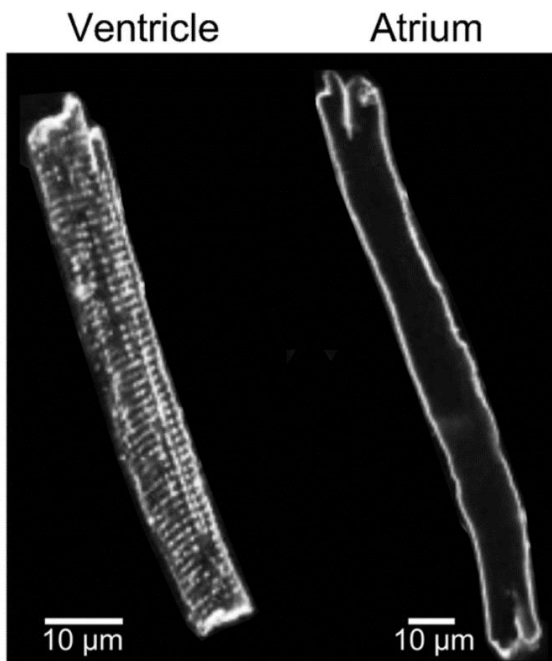


Abbildung 1-3:
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme
der T-Tubuli in ventrikulären und atrialen
Kardiomyozyten

Membranfärbung einzelner ventrikulärer und atrialer Kardiomyozyten mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Di-8-ANEPPS. In der ventrikulären Herzmuskelzelle (links) ist der regelmäßige Verlauf der T-Tubuli deutlich erkennbar, während in der atrialen Zelle (rechts) keine T-Tubuli gezeigt werden konnten. (modifiziert aus Abbildung 1 in Blatter LA, Kanaporis G, Martinez-Hernandez E, Oropeza-Almazan Y, Banach K. Excitation-contraction coupling and calcium release in atrial muscle. Pflugers Arch. 2021;473(3):317-329. doi:10.1007/s00424-020-02506-x ; Lizenznummer: 5191431452584)

1.4 Vorhofflimmern

Neben ihrer Rolle in der ventrikulären Füllung und als Impulsgeber der mechanischen Herzaktion können die Vorhöfe auch Ursprung einer Arrhythmie des Herzens sein. Der Begriff Arrhythmie beschreibt dabei eine Abweichung des Herzschlags von der regulären elektrischen Aktivierung oder der Reizweiterleitung, wie sie im Sinusrhythmus üblicherweise auftritt. Die weltweit häufigste Arrhythmie ist das Vorhofflimmern (VHF) mit weltweit 43,6 Mio. Erkrankten (Hindricks et al., 2021). Bei dem VHF handelt es sich um eine supraventrikuläre Tachyarrhythmie, welche mit einer unkoordinierten atrialen elektrischen Aktivierung auf der Basis von kreisenden Erregungen assoziiert ist. Folge dieser irregulären Aktivierung ist eine ineffektive atriale Kontraktion und eine unregelmäßige Überleitung der atrialen Depolarisation auf die Ventrikel, was zu einer arrhythmischen ventrikulären Aktivierung und Kontraktion führt. Dies ist durch unregelmäßige R-R Intervalle auf dem 12-Kanal EKG gut sichtbar (Heijman et al., 2014; Hindricks et al., 2021). VHF und Herzinsuffizienz weisen viele gemeinsame Risikofaktoren auf. Neben diesen allgemeinen kardialen Risikofaktoren (siehe 1.1.1) begünstigen auch parasymphatische und sympathische Stimuli das Auftreten von VHF (Chen et al., 2014). Insgesamt ist in den letzten Jahrzehnten ein deutlicher Anstieg der Prävalenz von VHF beobachtet worden, welcher sich durch den demographischen Wandel in Zukunft voraussichtlich noch weiter verstärken wird. Im Jahr 2010 lag die Prävalenz von VHF in Europa bei Erwachsenen >55 Jahren bei geschätzt 8,8 Mio.; ein weiterer Anstieg auf 17,9 Mio. Erkrankte bis zum Jahr 2060 wird aktuell prognostiziert (Benjamin et al., 2019). Die Prävalenz des VHF in Deutschland wurde in der populationsbasierten Guttenberg Health Studie mit 10.000 erwachsenen Teilnehmer:innen mit 3,1 % beziffert (Schnabel et al., 2015). Dies deckt sich mit der von Benjamin et al. im Jahr 2019 gezeigten Prävalenz von 2 bis 4 % bei Erwachsenen (Benjamin et al., 2019). Bereits aktuell ist in der europäischen Bevölkerung ein Lebenszeit-Risiko für die Entwicklung von VHF von etwa 33 % anzunehmen (Benjamin et al., 2019).

In der aktuellen Leitlinie für VHF aus dem Jahr 2020 werden fünf verschiedene Klassen des VHF unterschieden (Hindricks et al., 2021):

- Erstmalig-diagnostiziertes VHF: bisher nicht-diagnostiziertes VHF, unabhängig von Dauer und Symptomatik.

1 Einleitung

- Paroxysmales VHF: VHF, welches entweder spontan oder durch Intervention innerhalb von 7 Tagen nach Beginn des VHF konvertiert.
- Persistierendes VHF: VHF, welches über 7 Tage hinaus andauert und dann konvertiert oder durch Intervention terminiert wird.
- Lang-andauerndes persistierendes VHF: kontinuierliches VHF, welches über >12 Monate andauerte, bevor eine Rhythmus-Kontrolle angestrebt wird.
- Permanentes VHF: VHF, bei welchem keine weiteren Versuche der Wiederherstellung eines Sinusrhythmus unternommen werden.

Therapeutisch kann entweder eine Frequenzkontrolle (mit Reduktion der Herzfrequenz und gleichzeitiger Antikoagulation) oder eine Rhythmuskontrolle (mit elektrischer oder medikamentöser Kardioversion oder diversen Ablationsstrategien) vorgenommen werden (Hindricks et al., 2021). Eine Arbeit aus dem Jahr 2020 deutete an, dass insbesondere die frühe Rhythmuskontrolle durch Behandlung mit Antiarrhythmika oder durch Ablationstherapie zu einer Verminderung von kardiovaskulären Ereignissen führt (Kirchhof et al., 2020).

Ein VHF ist generell mit einer erhöhten Mortalität (RR: 1,95) und einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz (RR: 4,62) assoziiert (Ruddox et al., 2017). Insbesondere Frauen haben ein erhöhtes Risiko bei einer VHF-Erkrankung zu versterben (RR: 1,12 gegenüber Männern) (Benjamin et al., 2019).

Aufgrund der gemeinsamen Risikofaktoren von VHF und Herzinsuffizienz ist ein gleichzeitiges Auftreten sehr häufig. Bei vorbestehendem VHF oder vorbestehender Herzinsuffizienz entwickeln etwa 40 % der Patient:innen in der Folge auch die jeweils andere Erkrankung (Benjamin et al., 2019). Das zusätzliche Auftreten von Herzinsuffizienz bei vorbestehendem VHF oder das Auftreten von VHF bei vorbestehender Herzinsuffizienz ist dabei mit einer deutlich erhöhten Mortalität assoziiert (Wang et al., 2003). In einer Arbeit von Marijon et al. aus dem Jahr 2013 konnte gezeigt werden, dass 61 % der Patient:innen mit VHF an einer kardiovaskulären Ursache versterben, wobei der plötzliche Herztod (22,25 %) und eine fortschreitende Herzinsuffizienz (15,1 %) prozentual deutlich vor dem ischämischen Schlaganfall (7 %) liegen. Eine Herzinsuffizienz stellte mit einem Hazard-Ratio von 3,02 den größten individuellen Prädiktor der kardialen Mortalität von

1 Einleitung

Patient:innen mit VHF dar (Marijon et al., 2013). Eine gezielte Therapie und Prävention des VHF ist folglich bei Patient:innen mit Herzinsuffizienz von prognostisch herausragender Bedeutung.

Inwieweit neue Therapien der Herzinsuffizienz auf Gewebesebene jedoch Einfluss auf das (Neu)-Auftreten und die Kontrolle von VHF haben, wurde bisher noch unzureichend untersucht. Aus diesem Grund wird in der vorliegenden Arbeit ebenfalls untersucht, in wieweit eine ARNI-Therapie antiarrhythmische Effekte in einem atrialen in-vitro Modell unter adrenerger (proarrhythmischer) Stimulation und bei variierenden Stimulationsfrequenzen entfaltet. Außerdem wird die Frage untersucht werden, ob potenzielle antiarrhythmische Effekte durch das B-Typ Natriuretische Peptid bedingt werden. Diese Ergebnisse könnten schlussendlich das pathophysiologische Verständnis bezüglich einer ARNI-Therapie erweitern und so eine mechanistische Grundlage zu einer gezielteren klinischen Anwendung der Medikamente liefern.

1.5 Einflussfaktoren der (atrialen) myokardialen Funktion

Die systolische myokardiale Funktion hängt entscheidend von der Kontraktionskraft und der damit assoziierten Auswurfleistung des Herzens ab. Grundlegend spielen die Vorlast des Herzens und die Herzfrequenz eine zentrale Rolle in der Regulation der Kontraktilität. Neben diesen intrinsischen Mechanismen spielen Hormone eine herausragende Rolle in der Regulation der myokardialen Kontraktilität. Im Folgenden werden die im Rahmen dieser Arbeit relevanten Mechanismen und Hormonsysteme exemplarisch diskutiert. Da die Natriuretischen Peptide eine zentrale Rolle in dieser Arbeit einnehmen, werden sie im folgenden Kapitel separat besprochen.

1.5.1 Frank-Starling-Mechanismus und Slow Force Response

Eine akute Zunahme der Kontraktionskraft durch die verstärkte Dehnung des Myokards, etwa durch ein erhöhtes enddiastolisches Volumen in-vivo oder eine artifizielle Gewebsdehnung in-vitro, wird als Frank-Starling-Mechanismus (*FSM*) bezeichnet. Dies erlaubt eine kurzfristige Anpassung der Auswurfleistung an veränderte Füllungszustände der jeweiligen Herzkammer. Die funktionelle Basis dieses Mechanismus ist nicht vollständig geklärt und viele, teils überlappende, Theorien sind beschrieben. Im Wesentlichen lassen sich jedoch zwei Mechanismen abgrenzen: Zum einen wird durch die zunehmende Dehnung der Kardiomyozyten der Abstand zwischen Aktin und Myosin im Sarkomer vermindert, was eine verbesserte Interaktion und Überlappung der Filamente erlaubt und somit in einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für die Querbrücken-Bindungen resultiert, zum anderen führt die Dehnung zu einer Zunahme der Calcium-Sensitivität der Myofibrillen und bewirkt so ebenfalls eine Zunahme der Kontraktilität (Kawai und Jin, 2021; Moss und Fitzsimons, 2002). Der FSM ist sowohl im atrialen als auch im ventrikulären Myokard nachweisbar. Dies erlaubt auch bei gesteigerter Vorlast eine adäquate atrioventrikuläre Kopplung, da durch den FSM eine Zunahme der atrialen Boosterpumpen-Funktion möglich ist (Anwar et al., 2007). Auf ventrikulärer Ebene führt die gesteigerte ventrikuläre Füllung dann, ebenfalls vermittelt durch den FSM, zu einer Erhöhung des Auswurfvolumens der Ventrikel. In frühen Phasen einer Herzinsuffizienz kann durch eine Steigerung der Vorlast eine Einschränkung der Pumpfunktion kompensiert werden. Mit Fortschreiten der Herzinsuffizienz kommt es jedoch zu einer zunehmenden Einschränkung des FSM mit einem Verlust der Anpassung an variierende Vorlasten (Anwar et al., 2007; Schwinger et al., 1994).

Bei der Slow Force Response (*SFR*) handelt es sich um eine verzögerte (zweite) dehnungsabhängige Zunahme der Kontraktionskraft, welche etwa in den ersten zehn Minuten nach einer akuten Dehnung stattfindet. Die SFR tritt, wie der FSM, ebenfalls in atrialem und ventrikulärem Myokard auf. Die physiologischen Grundlagen der Beeinflussung der SFR sind vielfältig. So tragen die dehnungsabhängige Freisetzung von Peptiden (z.B. Angiotensin II), die Aktivierung dehnungsabhängiger Kationen-Kanäle, die Aktivierung weiterer Ionen-Kanäle (z.B. NCX, Na⁺/H⁺-Austauscher) und weitere Faktoren (z.B. NO) zur SFR-Regulation bei (Kockskämper et al., 2008; Von Lewinski et al., 2004).

1.5.2 Kraft-Frequenz-Kopplung

Auch durch die Herzfrequenz kann die Kontraktionskraft reguliert werden: Mit zunehmender Herzfrequenz steigt die entwickelte Kraft zunächst an, bevor sie bei einer Frequenz von etwa 1,5 Hz atrial (Schotten et al., 2002; Schwinger et al., 1993) und 2,5 Hz ventrikulär (Pieske et al., 1996; Schwinger et al., 1993) ihr Maximum erreicht und danach wieder abfällt. Dieser Mechanismus wird auch als Kraft-Frequenz-Beziehung oder Bowditch-Effekt bezeichnet (Bowditch, 1871). Ursächlich dafür ist unter anderem die frequenzabhängige Zunahme der intrazellulären Calcium-Transienten und eine Zunahme des Calcium-Gehalts des SR (Maier et al., 2000; Pieske et al., 1995). Diese positive Kraft-Frequenz-Beziehung ist jedoch bei der Herzinsuffizienz aufgehoben; in diesem Fall kommt es mit zunehmender Herzfrequenz bzw. Stimulationsfrequenz zu einer Verminderung der entwickelten Kontraktionskraft (Pieske et al., 1996, 1995).

1.5.3 Katecholamine (Adrenalin und Noradrenalin)

Bei den Katecholaminen Dopamin, Adrenalin und Noradrenalin handelt es sich um biogene Amine, welche in ihrer biochemischen Struktur eine 3,4-Dihydroxyphenyl-Gruppe (Catechol-Gruppe) gemeinsam haben (Nagatsu, 2007). Insbesondere ihre Bindung an die α - und β -Adrenorezeptoren (AR) ist für die Entstehung ihrer Wirkung im Körper relevant.

Die β -AR gehören zur Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) und bestehen aus sieben Transmembran Alpha-Helices. Der β -1-AR ist hauptsächlich im Herzen exprimiert und macht etwa 75 bis 80 % der kardialen β -ARs aus. Die restlichen 20 bis 25 % der β -ARs des Herzens sind auf den β -2-AR zurückzuführen (Madamanchi, 2007). Vor allem Adrenalin und Noradrenalin sind natürliche Agonisten aller β -ARs im menschlichen Körper.

Eine Bindung von (Nor-)Adrenalin an den kardialen β -1-AR führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors und einer daraus resultierenden Interaktion mit den aus drei Untereinheiten aufgebauten intrazellulären G_s -Proteinen (stimulierende G-Proteine). Die Alpha-Untereinheit des G-Proteins bewirkt dabei eine Aktivierung der Adenylatzyklase, welche den ‚second messenger‘ cAMP (zyklisches

1 Einleitung

Adenosin-Monophosphat) bildet. Dies führt zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration und einer daraus resultierenden Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) (Madamanchi, 2007). Die PKA phosphoryliert schließlich diverse in den kardialen Kontraktionszyklus involvierte intrazelluläre Proteine, beispielsweise Phospholamban, LTCC, RyR2, Troponin I oder Myosin-Bindeprotein C (Bers, 2002). Dies führt zu einer Zunahme der myokardialen Kraftentwicklung (Inotropie) und der myokardialen Relaxationsgeschwindigkeit (Lusitropie).

Der positiv-inotrope Effekt der PKA Aktivierung wird durch die Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration (beispielsweise durch die Phosphorylierung der LTCC oder des RyR2) und durch einer erhöhte Verfügbarkeit von Calcium aus dem SR vermittelt (Bers, 2002). Der positiv-lusitrope Effekt der PKA Aktivierung ist unter anderem auf die Phosphorylierung von Phospholamban und Troponin I zurückzuführen. Die Phospholamban-Phosphorylierung führt zu einer beschleunigten Calcium-Wiederaufnahme in das SR über die SERCA2a und trägt somit auch zur Erhöhung des SR-Calciumgehalts bei. Die Troponin I Phosphorylierung führt zudem zu einer Verminderung der Myofilament-Sensitivität und bewirkt dadurch eine beschleunigte Dissoziation des Calciums von den Myofilamenten. Insgesamt bewirkt die PKA Aktivierung durch diese Mechanismen eine Beschleunigung und Erhöhung der Calcium-Transienten-Amplitude (Bers, 2002).

Im Rahmen einer Herzinsuffizienz kommt es zu einer Verminderung der β -AR Expression im atrialen und ventrikulären Myokard. Interessanterweise führt dies im Ventrikel zu einer abgeschwächten Kraftzunahme bei zunehmenden Konzentrationen eines β -AR Agonisten im Vergleich zum gesunden Myokard; diese Kraftzunahme ist jedoch im Atrium auch bei Herzinsuffizienz vollständig erhalten (Schwinger et al., 1991). Aus diesem Grund ist im humanen Atrium das Vorhandensein einer β -AR Reserve wahrscheinlich, welches auch den absoluten Verlust von Rezeptoren bei fortschreitender Herzinsuffizienz funktionell kompensieren kann (Schwinger et al., 1991). In wieweit die funktionelle, adrenerge Reserve des atrialen Myokards durch endokrine oder parakrine Faktoren oder Medikamente moduliert wird, ist bisher nur unzureichend bekannt. Der Effekt von BNP und Sacubitrilat/Valsartan auf die atriale funktionelle Reserve soll aus diesem Grund im Rahmen der vorliegenden Promotion untersucht werden.

1.5.4 Angiotensin II

Angiotensin II (AT₂) ist ein Peptidhormon, welches aus acht Aminosäuren aufgebaut ist und aus dem Präkursor Angiotensinogen hervorgeht (Santos et al., 2019). Es ist integraler Bestandteil des RAAS und bindet unter anderem an den AT₂ Rezeptor Typ 1 (AT₁R). Bei diesem Rezeptor handelt es sich ebenfalls um einen Membranrezeptor mit sieben Transmembrandomänen, welcher seine Wirkung durch Interaktion mit einem G-Protein entfaltet. Die so ausgelösten intrazellulären Signalwege umfassen unter anderem eine Aktivierung der Phospholipase C mit einer Steigerung der intrazellulären Calciumkonzentration über Inositol-Triphosphat und eine Aktivierung der Janus-Kinase (Sparks et al., 2014). Die vielfältigen AT₂-Signalwege sind im Myokard mit oxidativem Stress, Zellhypertrophie, Fibrose und einer subklinischen Inflammation assoziiert (Ruzicka und Leenen, 1999; Santos et al., 2019; Szczepanska-Sadowska et al., 2018). Neben AT₂ liegen innerhalb des Myokards auch alle weiteren Bestandteile des RAAS vor. AT₂ wird im Herzen in intrazellulären Granulae gespeichert und durch Dehnung des Myokards freigesetzt, wodurch es parakrine Effekte am Myokard entfaltet (Sadoshima et al., 1993; Schuijt und Danser, 2002). Der Abbau von AT₂ wird durch Peptidasen wie Neprilysin oder Angiotensin Converting Enzym 2 vermittelt (Hubers und Brown, 2016; Sparks et al., 2014).

Im Rahmen einer Herzinsuffizienz kommt es zu einer kompensatorischen (jedoch aufgrund der zuvor dargelegten Effekten maladaptiven) Erhöhung der Aktivität des RAAS (Altamish et al., 2020). In funktionellen Untersuchungen an multizellulären myokardialen Präparationen (Muskelstreifen) konnte interessanterweise gezeigt werden, dass AT₂ eine Zunahme der entwickelten systolischen Kraft in atrialen aber nicht in ventrikulären Muskelpräparaten bewirkt (Holubarsch et al., 1993; von Lewinski et al., 2008). Castor-Chaves et al. beschreiben zudem eine Abnahme der diastolischen Spannung durch AT₂-Behandlung (Castro-Chaves et al., 2009). Inwieweit eine erhöhte Gewebskonzentration von AT₂ durch einen reduzierten Abbau des endogenen AT₂ durch Neprilysin-Blockade in-vitro jedoch positive oder negative funktionelle Effekte entfaltet, ist bisher noch unzureichend untersucht worden.

1.5.5 Endothelin 1 und Bradykinin

Bei Endothelin-1 (*ET-1*) und bei Bradykinin handelt es sich ebenfalls um vasoaktive Peptide, welche wie die bereits zuvor diskutierten Signalstoffe ihre jeweilige Wirkung über einen G-Protein gekoppelten Rezeptor mit sieben Transmembrandomänen ausüben (Davenport et al., 2016; Golias et al., 2007).

ET-1 ist ein vasokonstriktorisches Peptid, welches vor allem von endothelialen Zellen sekretiert wird. Es wird jedoch auch von anderen Zellen im kardiovaskulären System produziert, beispielsweise Kardiomyozyten oder glatten Muskelzellen. Die Bindung von ET-1 an den Endothelin-Rezeptor A (*ETA*), welcher vor allem in Herz und Lungen exprimiert ist, führt zu einer Aktivierung der Phospholipase C und einer daraus resultierenden Bildung der second messenger Inositol-Triphosphat und Diacylglycerol. Diese wiederum bewirken eine intrazelluläre Calcium-Freisetzung und eine Aktivierung der Proteinkinase C (Davenport et al., 2016; Marasciulo et al., 2006). ET-1 hat folglich eine positiv-inotrope Wirkung auf das Myokard, ist jedoch auch mit myokardialer Hypertrophie und Fibrose assoziiert (Davenport et al., 2016).

Bradykinin auf der anderen Seite führt in-vivo zu einer Vasodilatation und einer gleichzeitigen Zunahme der Gefäßpermeabilität (Golias et al., 2007; Hillmeister und Bondke Persson, 2020). Es liegt vor allem im Körpergewebe und weniger im Blutplasma vor und wird durch enzymatische Aktivierung von Kallikreinen aus Kininogen-Vorläufern gebildet (Golias et al., 2007). Eine Bindung von Bradykinin an den physiologisch vor allem vorliegenden Bradykinin-Rezeptor Typ 2 (*B2 Rezeptor*) führt zu einer Natriurese und bewirkt metabolische Anpassungen, welche einen gewissen Schutz vor einer Ischämie-Reperfusionsschädigung am Myokard bieten (Golias et al., 2007; Hillmeister und Bondke Persson, 2020; Manolis et al., 2010; Tschöpe et al., 2004). Eine Bindung an den B1 Rezeptor, welcher vor allem durch die Wirkung inflammatorischer Mediatoren exprimiert wird, wird hingegen eher mit einer schädlichen Wirkung am Myokard in Verbindung gebracht, wobei die Datenlage hierzu nicht als eindeutig zu beurteilen ist (Golias et al., 2007; Hillmeister und Bondke Persson, 2020; Manolis et al., 2010; Tschöpe et al., 2004). Insgesamt ist die biologische Stabilität des Bradykinin-Moleküls im menschlichen Körper durch den schnellen Abbau durch das Angiotensin-Converting-Enzym (*ACE*) oder durch Nephrylsin begrenzt (Golias et al., 2007; Hillmeister und Bondke Persson, 2020).

1.6 Natriuretische Peptide (NPs) und das Nephrylsin-System

1.6.1 Allgemein

Die Gruppe der Natriuretischen Peptide (NP) umfasst bisher drei bekannte Typen, welche zwischen 1981 und 1990 identifiziert wurden: das Atriale Natriuretische Peptid (ANP), das Brain Natriuretic Peptide oder B-Typ natriuretische Peptid (BNP) und das C-Typ natriuretische Peptid (CNP) (de Bold et al., 1981; Sudoh et al., 1990, 1988). Bei den NPs handelt es sich um Peptidhormone, welche aus 28 (ANP), 32 (BNP) und 22 (CNP) Aminosäuren aufgebaut sind (Fu et al., 2018). In ihrer Primärstruktur enthalten alle NPs einen aus 17 Aminosäuren bestehenden Ring, der für ihre biologische Aktivität von Bedeutung ist (Goetze et al., 2020). Da CNP am C-terminalen Ende dieses Rings keine weiteren Aminosäuren enthält, fehlen ihm die natriuretischen Eigenschaften der anderen beiden NP Subtypen. Zudem wird es kaum von Kardiomyozyten gebildet (Goetze et al., 2020), weswegen im Folgenden vor allem ein Fokus auf ANP- und BNP-assoziierte Prozesse gelegt wird.

Klassischerweise wird die Produktion von ANP vor allem im Atrium verortet, während BNP als eher ventrikulär synthetisiert angesehen wird (Kerkelä et al., 2015). Im Plasma gesunder Menschen liegt zudem die ANP-Konzentration über der BNP-Konzentration (Mukoyama et al., 1991). Neuere Übersichtsarbeiten zeigen jedoch, dass die Produktion von ANP und BNP im physiologischen Zustand im Wesentlichen auf die Atrien, insbesondere die Vorhöfohren, begrenzt ist (Goetze et al., 2020). Erst im Rahmen einer linksventrikulären Dysfunktion mit Druck- oder Volumenüberlastung des linken Ventrikels kommt es zu einer zunehmenden Synthese und Ausschüttung von BNP (und ANP) aus ventrikulären Kardiomyozyten (Goetze et al., 2020). Beim Vorliegen einer Herzinsuffizienz steigt folglich die Plasmakonzentration von BNP relativ gesehen stärker an als die Konzentration von ANP; die absolute Plasmakonzentration von ANP lag in einer Studie an Patient:innen mit terminaler Herzinsuffizienz jedoch weiterhin fast 40 % über der Konzentration von BNP (356±21 ng/l vs. 259±57 ng/l) (Fu et al., 2018; Goetze et al., 2020; Ramos und de Bold, 2006).

Die vornehmlich atriale bzw. aurikuläre Sekretion von NPs beruht auf einer Besonderheit des atrialen Myokards: Dieses enthält in großer Zahl Kardiomyozyten vom sekretorisch-kontraktilen Phänotyp, dessen Zellorganellen speziell an die Synthese und Sekretion von Polypeptidhormonen angepasst sind (Goetze et al., 2020). Studien zur Rolle einer Nephrylsin-Inhibition auf die myokardiale Funktion und

Arrhythmogenese an atrialem Myokard sind aufgrund der hohen NP-Dichte in den dortigen spezialisierten Kardiomyozyten folglich von besonderem Interesse.

1.6.2 Synthese und Freisetzung von NPs

Im menschlichen Körper sind die Gene für die Präkursoren von ANP (*NPPA*) und BNP (*NPPB*) auf Chromosom 1 lokalisiert. Beide Gene sind jeweils aus zwei Introns und drei Exons aufgebaut. Die Expression der NP Gene wird vor allem durch endokrine Stimuli wie etwa Endothelin-1 oder eine mechanische Belastung des Myokards heraufreguliert (Gardner et al., 2007). In der Transkription von *NPPA* und *NPPB* spielt dabei die GATA Transkriptionsfaktor-Familie (vor allem GATA-4 und GATA-6) eine zentrale Rolle, welche an die Basensequenz ATGATAA/G bindet und so zu einer erhöhten Transkription dieser Präkursoren beiträgt (Gardner et al., 2007). Die Transkription und Translation des *NPPA* und *NPPB* Gens führt zur Synthese der jeweiligen Präprohormone von ANP und BNP (*präproANP* und *präproBNP*). Durch Signalpeptidasen werden diese Präprohormone in einem nächsten Schritt in *proANP* und *proBNP* umgewandelt. Schließlich werden diese Prohormone durch die Serinendoproteasen Corin und Furin in das N-terminale Prohormon (*NT-proANP* oder *NT-proBNP*) und in das tatsächliche Peptidhormon (ANP oder BNP) aufgespalten. Corin spielt dabei eine entscheidende Rolle in der Aufspaltung von *proANP*, während *proBNP* durch Corin oder Furin aufgespalten wird (Fu et al., 2018; Goetze et al., 2020; Semenov et al., 2010). Ein schematischer Ablauf der Prozesse ist in Abbildung 1-4 dargestellt.

proANP und *BNP* werden im Anschluss gemeinsam in den Granula der sekretorisch-kontraktilen atrialen Kardiomyozyten gespeichert und durch verschiedene Stimuli freigesetzt: Peptidhormone wie ET-1 und AT2 bewirken beispielsweise eine Freisetzung von NPs, welche durch G_q gekoppelte Rezeptoren vermittelt wird (Goetze et al., 2020). Auch eine Behandlung mit dem β -AR Agonisten Isoproterenol bewirkt *in vitro* eine direkte Freisetzung von ANP (Agnolletti et al., 1992). Zudem bewirkt eine Dehnung des Myokards eine Freisetzung von NPs, welche durch $G_{i/o}$ gekoppelte Rezeptoren vermittelt wird (Agnolletti et al., 1992; Goetze et al., 2020; Kerkelä et al., 2015). Für BNP ist schließlich ein Zytokin-abhängiger Sekretionsmechanismus beschrieben, welcher mit diversen Zytokinen (wie bspw. Interleukin-1 β oder -6) eine

1 Einleitung

p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase Aktivierung gemeinsam hat (Fu et al., 2018; Gardner et al., 2007; Goetze et al., 2020).

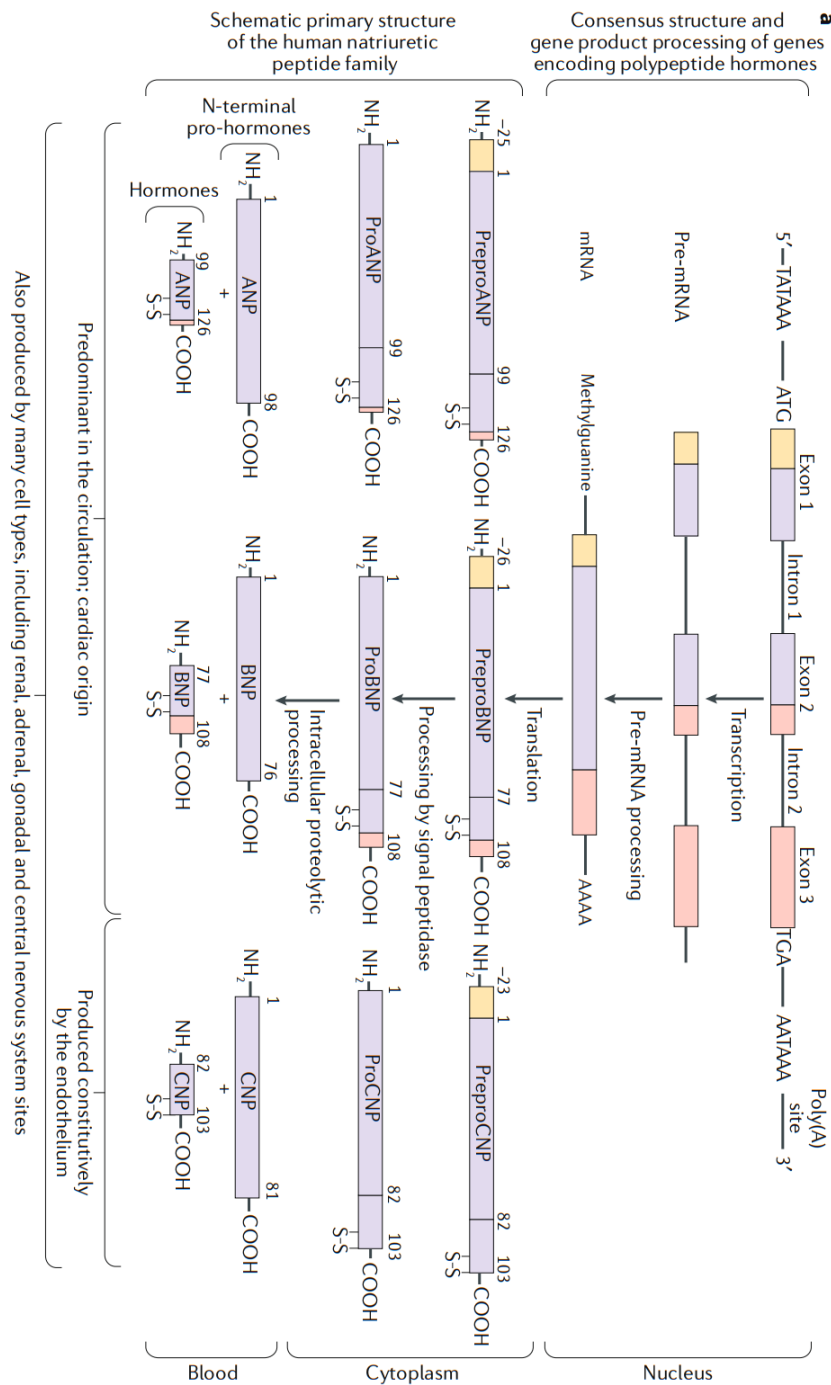


Abbildung 1-4: Transkription, Translation und posttranslationale Modifikation des NPPA und NPPB Gens – Synthese der NPs

ANP: Atriales Natriuretisches Peptid; BNP: B-Typ Natriuretisches Peptid, CNP: C-Typ Natriuretisches Peptid, NPPA: Natriuretic Peptide Precursor A, NPPB: Natriuretic Peptide Precursor B

(modifiziert aus Abbildung 3 in Goetze JP, Bruneau BG, Ramos HR, Ogawa T, de Bold MK, de Bold AJ. Cardiac natriuretic peptides. Nat Rev Cardiol. 2020;17(11):698-717. doi:10.1038/s41569-020-0381-0; Lizenznummer: 5206080427009)

1.6.3 Funktion und Metabolismus von NPs

Die NPs entfalten ihre Wirkung durch Bindung an drei NP-spezifische Rezeptoren, welche zur Gruppe der membrangebundenen Guanylatzyklasen (auch: Guanylylzyklasen) gehören: den NP Rezeptor Typ A (*NPR-A*), den NP Rezeptor Typ B (*NPR-B*) und den NP Rezeptor Typ C (*NPR-C*) (Goetze et al., 2020). Der NPR-A wird vornehmlich von ANP und BNP (mit größerer Bindungsstärke für ANP) aktiviert, während der NPR-B primär durch die Bindung von CNP aktiviert wird (Fu et al., 2018; Goetze et al., 2020). Beim NPR-C handelt es sich, basierend auf dem heutigen Wissensstand, vorwiegend um einen Rezeptor, welcher mit dem Abbau von NPs assoziiert ist. Die Bindungsstärke von BNP an den NPR-C liegt bei nur 7 % der ANP Bindung (Fu et al., 2018; Gardner et al., 2007; Goetze et al., 2020).

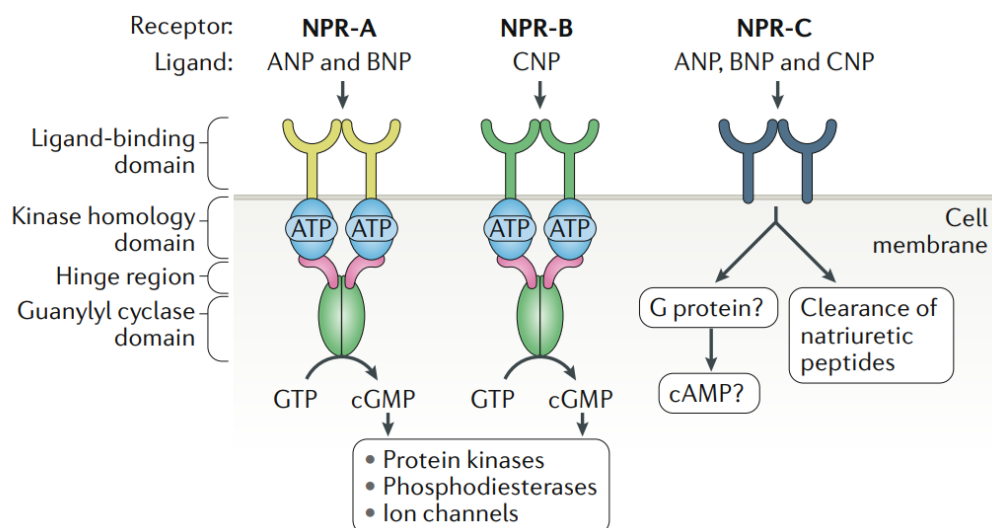


Abbildung 1-5: Rezeptorsubtypen und Signalwege der NP-Rezeptoren

NPR-A: NP Rezeptor Typ A, NPR-B: NP Rezeptor Typ B, NPR-C: NP Rezeptor Typ C, ANP: Atriales Natriuretisches Peptid, BNP: B-Typ Natriuretisches Peptid, CNP: C-Typ Natriuretisches Peptid, ATP: Adenosin-Triphosphat, cAMP: zyklisches Adenosin-Monophosphat, GTP: Guanodin-Triphosphat, cGMP: zyklisches Guanodin-Monophosphat

(Abbildung 6 aus Goetze JP, Bruneau BG, Ramos HR, Ogawa T, de Bold MK, de Bold AJ. Cardiac natriuretic peptides. Nat Rev Cardiol. 2020;17(11):698-717. doi:10.1038/s41569-020-0381-0; Lizenznummer: 5206470063309)

Die NPRs sind im ganzen Körper exprimiert, unter anderem auch auf Kardiomyozyten, im Hirn und in den Nieren. Die Subtypen NPR-A und NPR-B sind aus einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Domäne aufgebaut; letztere enthält unter anderem auch die Guanylatzyklasedomäne (siehe Abbildung 1-5) (Fu et al., 2018; Goetze et al., 2020). Eine Ligandenbindung an den jeweiligen Rezeptor führt zu einer

1 Einleitung

Konformationsänderung des Rezeptors mit einer damit einhergehenden Aktivierung der intrazellulären Guanylatzyklasedomäne und einer Umsetzung von Guanosin-Triphosphat (*GTP*) zu zyklischem Guanosin-Monophosphat (*cGMP*) (Fu et al., 2018; Gardner et al., 2007; Goetze et al., 2020). Die Zunahme der intrazellulären *cGMP* Konzentration führt zu einer Aktivierung der *cGMP*-abhängigen Proteinkinasen (*PKG*), zur Aktivierung von *cGMP* abhängigen Ionenkanälen und zu einer Veränderung der Aktivität verschiedener *cGMP* regulierter Phosphodiesterasen (*PDE*), wie etwa *PDE1*, *PDE2* oder *PDE3* (Fu et al., 2018; Goetze et al., 2020; Zaccolo und Movsesian, 2007).

NPs bewirken, wie aus der Namensgebung hervorgeht, primär eine Zunahme der Natriurese und der allgemeinen Diurese, da durch die gesteigerten intrazellulären *cGMP* Spiegel eine Inhibition des apikalen Natrium-Kanals und der basolateralen Na-K-ATPase im Sammelrohr der Niere bewirkt wird (Fu et al., 2018; Kerkelä et al., 2015). Die NP-vermittelte Vasodilatation ist ebenfalls zu einem gewissen Teil von der *cGMP/PKG*-Achse abhängig: in der glatten Muskulatur führt die *PKG* durch die Phosphorylierung verschiedener Substrate zu einer Verminderung der zytosolischen Calcium-Konzentration, was eine Relaxation der glatten Muskulatur der Gefäßwände und somit eine direkte Senkung des arteriellen Blutdrucks bewirkt (Goetze et al., 2020).

Außerdem spielen NPs eine zentrale Rolle in der Suppression einer kardialen Fibrose und Hypertrophie sowie im Allgemeinen bei Mechanismen des myokardialen Umbaus. Mehrere synergistische Mechanismen sind hierbei anzuführen: NPs bewirken durch die Unterdrückung des lokalen kardialen RAAS, durch die Inhibition vasoaktiver Peptide (wie etwa ET-1) und durch die Inhibition verschiedener Wachstumsfaktoren (wie etwa TGF β) eine Reduktion der kardialen Fibroblastenproliferation und -migration mit konsekutiv verminderter Gewebsfibrose (Fu et al., 2018; Kerkelä et al., 2015). In einer Arbeit von Calderone et al. konnte zudem gezeigt werden, dass auch die Noradrenalin-vermittelte Hypertrophie von Kardiomyozyten und Fibroblasten durch ANP vermindert wird. Experimentell fanden sich Hinweise darauf, dass dies auf einer *cGMP*-vermittelte Hemmung des Ca²⁺-Einstroms in die Zellen, welcher durch Noradrenalin verstärkte wurde, beruhen könnte (Calderone et al., 1998). Systemische Effekte wie die Reduktion der kardialen Vor- und Nachlast tragen ebenfalls zum antihypertrophen Effekt der NPs bei (Fu et al., 2018; Kerkelä et al., 2015). Einige Arbeiten deuten schlussendlich darauf hin, dass auch direkte antihypertrophe

1 Einleitung

Signalwege infolge der NP-Bindung an den NPR-A aktiviert werden könnten (Holtwick et al., 2003; Kerkelä et al., 2015; Knowles et al., 2001).

Interessanterweise zeigte eine Arbeit von Chen et al. aus dem Jahr 2000, dass eine subkutane Injektion von BNP über 10 Tage in einem kaninen Herzinsuffizienz-Modell zu einer Verbesserung des Herzzeitvolumens, sowie zu einer Verringerung des Lungenkapillarenverschlussdrucks und des Gefäßwiderstands führte. Eine subkutane Injektion einer hohen BNP Dosis führte zudem 30 Minuten nach Verabreichung zu einem erhöhten Herzzeitvolumen und zu einer Verminderung des mittleren arteriellen Blutdrucks (Chen et al., 2000). Diese Ergebnisse legen nahe, dass NPs auch direkte, akute Effekte auf die kardiale Pumpfunktion haben könnten. Eine solcher akuter Effekt konnte ebenfalls in einem Mausmodell der frühen kardialen Hypertrophie gezeigt werden: Nach einer Vorbehandlung mit Isoproterenol führte die zusätzliche Gabe von ANP zu einer weiteren Zunahme der Sarkomerverkürzung, welche in der Kontrollgruppe nicht zu beobachten war. Als Ursache dieses Mechanismus wurde eine räumliche Neuordnung der Phosphodiesterasen PDE2 und PDE3 bei früher Hypertrophie identifiziert, welche zu einer cGMP-vermittelten Zunahme der in-vitro und in-vivo Kontraktilität führt (Perera et al., 2015). Im Gegensatz dazu zeigte sich in in-vitro Experimenten an humanen atrialen Muskelstreifen nach akuter ANP-Behandlung ohne Isoproterenol-Vorbehandlung jedoch ein negativ-inotroper Effekt (Kockskämper et al., 2008). Auf Basis der zuvor genannten Studien stellt sich somit die Frage, ob NPs unter β -adrenerger Stimulation zu einer Erhöhung der funktionellen inotropen Reserve und einer verbesserten Lusitropie im humanen atrialen Myokard beitragen können, was im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden soll.

Es ist in diesem Kontext relevant zu bedenken, dass im Verlauf einer Herzinsuffizienz eine verminderte Wirksamkeit der NPs zu beobachten ist, welche unter anderem auf einer Herabregulation der NPRs, einem erhöhten Abbau der NPs und einer verminderten intrazellulären Signalfortleitung beruht (Hubers und Brown, 2016).

1.6.4 Abbau von NPs

Die Plasmahalbwertszeit (*Plasma-HWZ*) der NPs ANP und BNP ist äußerst begrenzt: Sie beträgt für ANP 2 bis 4 Minuten und für BNP etwa 20 Minuten (Goetze et al., 2020).

1 Einleitung

Aus diesem Grund werden zur Abschätzung der Plasmakonzentration von ANP und BNP die Plasmaspiegel der proteolytischen Produkte *mittregionales pro-ANP* und *NT-pro BNP* als Surrogat-Parameter verwendet, welche eine Plasma-HWZ von etwa 90 Minuten aufweisen (Goetze et al., 2020). Insbesondere für den Abbau von ANP liegen detaillierte Organstudien vor, die zeigen konnten, dass vor allem die Lungen, die Leber und die Nieren in die Degradation von ANP involviert sind (Hollister et al., 1989).

Der Abbau von ANP und BNP im menschlichen Kreislauf wird durch verschiedene Systeme vermittelt. Im Wesentlichen spielen dabei der NPR-C und das Nephilysin-System eine Rolle; zudem ist eine Beteiligung des Insulin-abbauenden Enzyms Insulysin (*IDE*) und der Dipeptidylpeptidase-4 (*DPP-4*) beschrieben worden (Goetze et al., 2020; Potter, 2011).

Wie bereits zuvor dargelegt, bindet der Clearance-Rezeptor NPR-C ANP etwa 14-mal stärker als BNP, was auch als Erklärung für die längere Plasma-HWZ von BNP angeführt wird (Fu et al., 2018). Nach der Rezeptorbindung an den NPR-C kommt es zu einer Clathrin-vermittelten Endozytose des Hormon-Rezeptor-Komplexes und zu einer lysosomalen Hydrolyse der gebundenen NPs. Der Rezeptor wird im Rahmen dieser Hydrolyse nicht abgebaut, sondern nach dem Abbau des Liganden erneut auf der Zelloberfläche exprimiert (Fu et al., 2018; Potter, 2011).

Nephilysin (*NEP*), auch neutrale Endopeptidase genannt, ist eine Zink-Metallopeptidase, welche in den Abbau (vasoaktiver) Peptide involviert ist. Sie ist auf der Zellmembran exprimiert und hydrolysiert diverse extrazelluläre Peptidhormone, neben NPs beispielsweise auch Bradykinin, ET-1, Glukagon und AT₂ (Hubers und Brown, 2016; Turner et al., 2001). Initial hydrolysiert NEP den charakteristischen Aminosäure-Ring der NPs in der N-terminalen Region zwischen Cystein und Phenylalanin, was ein Aufbrechen des Rings und somit eine Inaktivierung der Peptide zur Folge hat (Fu et al., 2018). NEP ist vor allem im Bürstensaum des proximalen Tubulus der Niere, dem Gastrointestinaltrakt (vor allem Duodenum und Dünndarm), der Leber und den Lungen exprimiert (Uhlén et al., 2015). Bei Frauen ist zudem eine hohe Expression im Brustgewebe nachgewiesen worden, während bei Männern zusätzlich eine hohe Expression in der Prostata, den Samenbläschen und dem Nebenhoden gefunden wurde (Uhlén et al., 2015). Auch für NEP ist eine höhere Affinität für ANP (und CNP) im Vergleich zu BNP beschrieben (Fu et al., 2018; Hubers

1 Einleitung

und Brown, 2016). Inwieweit die lokale NEP-Expression im Myokard durch eine Herzinsuffizienz beeinflusst wird und den kardialen NP-Metabolismus beeinflusst, ist aktuell unklar: Während eine ältere Arbeit eine Hochregulation von NEP im LV der Herzen von Patient:innen mit Herzinsuffizienz zeigte (Fielitz et al., 2002), wurde in einer im Jahr 2020 erschienenen Arbeit in einem porcinen HFrEF-Modell eine globale Verminderung der NEP-Expression im Organismus nachgewiesen (Pavo et al., 2020).

Bei IDE handelt es sich um eine Zink-Metalloprotease, welche neben Insulin zu einem geringen Teil auch in die Spaltung und Degradation von ANP involviert ist. Für BNP ist ebenfalls eine IDE-vermittelte Spaltung beschrieben, wobei ANP unter den NPs jedoch als das bevorzugte Substrat von IDE identifiziert wurde (Fu et al., 2018; Potter, 2011).

DPP-4 ist schließlich ein integrales Membranprotein der Prolyl-Oligopeptidase-Familie, welches insbesondere in den Abbau des Glukagon-like Peptide-1 (GLP-1) involviert ist (Deacon, 2019). Es ist darüber hinaus ebenfalls in den Abbau von 1-32 BNP zu 3-32 BNP involviert, welches im Vergleich zu 1-32 BNP eine verminderte kardioresnale Wirkung entfaltet, jedoch weiterhin zu einer Stimulation der cGMP-Synthese führt (Huntley et al., 2015).

Neben den genannten Mechanismen sind jedoch weitere, bisher unbekannte Wege der NP-Inaktivierung, insbesondere für BNP, anzunehmen (Potter, 2011).

1.7 Rolle und Einfluss der ARNIs auf Herzinsuffizienz und Arrhythmien

1.7.1 Pharmakologische Beeinflussung des NP-Systems

Die im vorherigen Kapitel dargelegten vorteilhaften Effekte der NPs auf Diurese, Blutdruck und kardiales Remodelling führten dazu, dass das NP-System in den letzten Jahrzehnten als Zielsystem neuer Herzinsuffizienz-Therapien identifiziert wurde (Hubers und Brown, 2016).

Aus der Gruppe der rekombinanten humanen NPs wurde Nesiritide im Jahr 2001 von der *Food and Drug Administration (FDA)* zur intravenösen Behandlung der akuten, dekompensierten Herzinsuffizienz in den USA zugelassen. Nachdem im Jahr 2005 jedoch Sicherheitsbedenken in Bezug auf eine gesteigerte 30-Tages-Mortalität nach Nesiritide-Therapie sowie potenzielle nephrotoxische Effekte geäußert wurden, wurde

1 Einleitung

die Anwendung deutlich eingeschränkt (Sackner-Bernstein et al., 2005; Topol, 2005). Eine im Jahr 2011 veröffentlichte Studie mit 7141 eingeschlossenen Patient:innen zeigte schließlich, dass eine Behandlung mit Nesiritide zu keiner signifikanten Verbesserung der Dyspnoe und des Überlebens von Patient:innen mit akut dekompenzierter Herzinsuffizienz führte (O'Connor et al., 2011).

Auch initiale Studien in den 1990er Jahren mit oralen NEP-Inhibitoren wie etwa Candoxatril zeigten gemischte Effekte: Eine Behandlung führte zwar zu einer Erhöhung der Plasma-ANP-Spiegel und senkte die Füllungsdrücke des linken und rechten Ventrikels, war jedoch gleichzeitig mit einer Steigerung des arteriellen Blutdrucks assoziiert (Ando et al., 1995; Elsner et al., 1992). Es konnte dabei gezeigt werden, dass die Steigerung des systolischen Blutdrucks unter anderem auf einen verminderten Abbau von AT₂ zurückzuführen ist (Hubers und Brown, 2016; Richards et al., 1992). Diese Erkenntnis führte zur Kombination der NEP-Inhibitoren mit einem AT₁-Antagonisten, welche schließlich in der Entwicklung des Kombinationspräparats Sacubitril/Valsartan mündete (Hubers und Brown, 2016).

1.7.2 Struktur und Pharmakologie von Sacubitril/Valsartan

Sacubitril/Valsartan (Entresto®) wird aus dem NEP-Inhibitor Sacubitril und dem AT₁-Rezeptor-Blocker Valsartan zusammengesetzt und bildet den ersten Vertreter der Substanzgruppe der Angiotensin-Rezeptor-Neprilysin-Inhibitoren (*ARNI*). In der oralen Verabreichungsform werden die beiden pharmakologischen Bestandteile kristallisiert und in einen supramolekularen Natriumkomplex eingebettet, welcher neben Natrium und Wasser je sechs Sacubitril- und sechs Valsartan-Moleküle enthält (Feng et al., 2012). Nach der oralen Verabreichung des Medikaments dissoziiert dieser Komplex wieder zu Sacubitril und Valsartan. Sacubitril wird in einem nächsten Schritt durch verschiedene Esterasen, vor allem durch die Carboxylesterase 1 in der Leber, zu Sacubitrilat (*LBQ657*) hydrolysiert, welches den aktiven Metaboliten darstellt (Akahori et al., 2017; Shi et al., 2016). Bei LBQ657 handelt es sich um einen kompetitiven NEP-Inhibitor, welcher an die katalytisch-wirksame NEP-Region bindet (Schiering et al., 2016).

Nach der oralen Aufnahme von Sacubitril/Valsartan (*Sac/Va*) wird die maximale Plasmakonzentration von Sacubitril dosisabhängig nach 0,5 bis 1 h, diejenige von

1 Einleitung

LBQ657 nach 1,8 bis 3,1 h und die von Valsartan nach 1,5 bis 4,9 h erreicht (Akahori et al., 2017; Gu et al., 2010). Eine gleichzeitige Nahrungsaufnahme führt zum verzögerten Erreichen der maximalen Plasmakonzentration (Akahori et al., 2017). In einer weiteren Untersuchung an Ratten konnten Gu et al. zudem zeigen, dass es bereits 15 Minuten nach oraler Verabreichung von Sac/Val zu einem signifikanten Anstieg der Plasmakonzentration von ANP kommt (Gu et al., 2010). Eine relevante Inhibition des NP Abbaus ist also bereits kurz nach Verabreichung zu beobachten.

Die mittlere Halbwertszeit von LBQ657 liegt je nach Dosis und untersuchter Patient:innengruppe bei 12,1 bis 15,8 h, für Valsartan ist eine Halbwertszeit von 11,0 bis 22,6 h je nach Dosis von Sac/Val gezeigt worden (Akahori et al., 2017; Gu et al., 2010). Nach der Hydrolyse von Sacubitril in LBQ657 findet keine weitere Metabolisierung des Nephilysin-Inhibitors mehr statt. Etwa 52 bis 68 % des LBQ657 werden renal eliminiert, die übrigen 32 bis 48 % werden mit der Fäzes ausgeschieden. Auch Valsartan wird weitgehend unmetabolisiert aus dem menschlichen Körper ausgeschieden; etwa 86 % von Valsartan und Valsartanmetaboliten werden über die Fäzes ausgeschieden (Hubers und Brown, 2016).

1.7.3 Effekte von Sacubitril/Valsartan auf Herzinsuffizienz und Arrhythmien

In der 2014 publizierte PARADIGM-HF-Studie wurde die Wirkung einer Behandlung mit Sac/Val mit einer Enalapril-Therapie in 8442 Patient:innen mit HFrEF (EF<40 % und NYHA II-IV) verglichen. Die Behandlung mit Sac/Val, ergänzend zu einer bestehenden, leitliniengerechten Herzinsuffizienztherapie, bewirkte dabei eine Verminderung der kardiovaskulären Sterblichkeit um 20 %, eine Verminderung der Herzinsuffizienz-Hospitalisierungsrate um 21 % und eine Linderung der Symptomschwere und der körperlichen Einschränkung (McMurray et al., 2014). In der Sac/Val-Gruppe wurden höhere Raten an Hypotension und Angioödem berichtet, allerdings war der Anteil an Patient:innen mit fortschreitender Nierenerkrankung, Hypokaliämie und Reizhusten geringer als in der Enalapril-Gruppe (McMurray et al., 2014). In der SAVE-ICD Studie an 230 Patient:innen mit HFrEF zeigte sich außerdem eine EF-Zunahme von durchschnittlich 3,9 % sechs Monate nach Behandlungsbeginn mit Sac/Val, welche mit einer Reduktion der linksventrikulären endsystolischen und enddiastolischen Volumina assoziiert war (Guerra et al., 2021). Zudem führte die

1 Einleitung

Therapie mit Sac/Val zu einer anhaltenden Reduktion der NT-pro BNP und Troponin T Spiegel, was auf eine verminderte Dehnung und Belastung des Myokards hinweist (Packer et al., 2015). Gleichzeitig bewirkte die Behandlung mit Sac/Val eine Erhöhung der BNP-Plasmakonzentration und der cGMP-Urinkonzentration der Patient:innen, was den Effekt der Therapie mit Sac/Val auf das NP-System und die zugehörigen Signalwege unterstreicht (Packer et al., 2015).

Infolge des Therapieerfolgs von Sac/Val bei der HFrEF-Behandlung wurde in der PARAGON-HF-Studie untersucht, welchen Effekt eine ARNI-Therapie im Vergleich zu einer Valsartan-Therapie bei Patient:innen mit HFpEF (EF>45 % und NYHA II-IV) hat. Während der primäre Endpunkt (zusammengesetzt aus Hospitalisierung wegen Herzinsuffizienz und kardiovaskulärem Tod) in dieser Studie knapp verpasst wurde (RR: 0,87 (0,75-1,01); p=0,06), zeigte sich in den sekundären Endpunkten eine signifikante Verbesserung der Symptomschwere (OR: 1,45 (1,13-1,86)) und eine nephroprotektive Wirkung (HR: 0,50 (0,33-0,77)) in der mit Sac/Val-behandelten HFpEF-Patient:innengruppe (Solomon et al., 2019).

Neben der Anwendung von Sac/Val in der Behandlung der Herzinsuffizienz, insbesondere der HFrEF, wurde in den letzten Jahren zunehmend auch der Effekt der Sac/Val-Behandlung auf ventrikuläre und supraventrikuläre Arrhythmien untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Behandlung mit einem ARNI auch das Auftreten von ventrikulären und supraventrikulären Arrhythmien vermindern konnte (de Diego et al., 2018; De Vecchis et al., 2020).

Zur Klärung dieses potenziellen, antiarrhythmischen Effekts von Sac/Val liegen derzeit nur wenige funktionelle Studien vor, welche mechanistische Einblicke in die Wirkung der NEP-Inhibition auf die Entstehung von Arrhythmien geben könnten. So ist weitgehend ungeklärt, ob Sac/Val direkt antiarrhythmische Effekte am Myokard entfaltet, oder ob dies Nebeneffekt einer Substratmodifikation im Myokard bei chronischer Applikation ist. Insbesondere für das VHF als häufigste Herzrhythmusstörung wären solche Erkenntnisse von großer Bedeutung, um neben den interventionellen Therapiestrategien auch weitere (präventive) medikamentöse Therapien zu identifizieren. Weiterhin wären diese Forschungsergebnisse auch vor dem Hintergrund der gemeinsamen Risikofaktoren und der Koinzidenz von Herzinsuffizienz und VHF, sowie dem gesteigerten Risiko ventrikulärer Arrhythmien

bei einer stark reduzierten Pumpfunktion des Herzens, von größtem Interesse (Nuss et al., 1999).

1.8 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Die Atrien des Herzens leisten einen großen Beitrag zur Aufrechterhaltung der globalen Herzfunktion. Eine Modulation der atrialen Funktion bzw. funktionellen Reserve durch (B)NP ist aufgrund experimenteller Studien anzunehmen, aber bisher nicht ausreichend in humanem atrialen Myokard untersucht worden. Klinische Studien weisen zudem darauf hin, dass eine Behandlung mit einem ARNI zu einer Verminderung des Auftretens von atrialen Arrhythmien führt. Die zugrundeliegenden Mechanismen wurden jedoch bisher nur unzureichend in humanen atrialen Präparaten untersucht und sind unklar.

Aus diesem Grund wird ein Fokus dieser Arbeit auf der Rolle des NP-Systems in der Modulation der atrialen Funktion und Arrhythmogenese sowie der pharmakologischen Beeinflussbarkeit des endogenen myokardialen NP-Systems durch eine NEP-Inhibition liegen. Zudem soll durch die Untersuchung der NEP-Expression in atrialen und ventrikulären Myokardbiopsien ein genaueres Verständnis der Regulation der NEP-Expression bei Herzinsuffizienz mit reduzierter Pumpfunktion erlangt werden.

Die Arbeit untersucht dabei im Detail die folgenden Hypothesen:

- 1) BNP verbessert die atriale Inotropie und Lusitropie und entfaltet weiterhin eine antiarrhythmische Wirkung an humanem atrialem Myokard nach Zugabe von Isoproterenol (= unter adrenerger Stimulation).
- 2) LBQ657 ± Valsartan können die potenziellen Effekte von BNP auf das atriale Myokard (funktionell und antiarrhythmisch) durch die Hemmung des lokalen NP-Abbaus reproduzieren.
- 3) Es besteht ein Zusammenhang zwischen klinischem Patientenphänotyp und atrialer in-vitro Funktion.
- 4) Neprilysin ist im humanen Myokard (atrial/ventrikulär) abhängig von kardialen Funktionsparametern und/oder dem klinischen Patientenphänotyp exprimiert

2 Methodik

2.1 Gewebeproben

Die in der vorliegenden Arbeit analysierten atrialen Gewebeproben stammen von Patient:innen, welche sich einer offenen Herzoperation unter Verwendung einer Herz-Lungen-Maschine unterzogen. Eine genaue Aufstellung der Patient:innen-Charakteristika findet sich im Hauptteil dieser Arbeit (siehe Kapitel 3.2 *Charakterisierung der Patient:innen*). Bei der überwiegenden Mehrheit der Operationen handelte es sich um Koronararterien-Bypass Operationen. Diese wurden in der Klinik für kardiovaskuläre Chirurgie der Charité- Universitätsmedizin Berlin (CUB) und der Klinik für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie des Deutschen Herzzentrum Berlin (DHZB) im Zeitraum von Juli 2018 bis März 2020 durchgeführt. Die Verwendung der Proben wurde von der Ethikkommission der CUB begutachtet und bewilligt (EA2/167/15 und EA4/028/12) und entsprach den ethischen Grundsätzen der Deklaration von Helsinki. Alle Patient:innen waren volljährig und willigten nach Aufklärung schriftlich in die Entnahme einer Biopsie und die Erfassung klinischer und anamnestischer Informationen ein. Patient:innen mit aktiver Tumorerkrankung, angeborenen Herzfehlbildungen oder aktiver Endokarditis wurden nicht in die Studie eingeschlossen. Ein Patient wurde zudem wegen eines chronischen Verschlusses der rechten Koronararterie (mit einhergehenden metabolischen und strukturellen Veränderungen im RAA) nicht in die Analyse eingeschlossen (Primessnig & Deißler et al., 2022)¹.

Im Rahmen der durchgeführten Operationen wurde standardmäßig eine Kanülierung des rechten Vorhofs im Bereich des rechten Herzohrs (*Auricula cordis dextra*) zur Schaffung des venösen Schenkels der Herz-Lungen-Maschine durchgeführt. Das im Rahmen der Kanülierung entfernte Stück des rechten Herzohrs mit den enthaltenen *Musculi Pectinati* (kamm- bzw. trabekelförmige Muskulatur) wurde anschließend unmittelbar in ein konisches Zentrifugenröhrchen (50 ml; Kisker Biotech GmbH & Co.KG, Steinfurt, Deutschland) mit kardiopleger Transportlösung überführt und von den Operateuren an die Doktoranden weitergegeben. Der Probentransport in das Muskelstreifenlabor erfolgte direkt im Anschluss innerhalb der ersten 5-10 Minuten nach Entnahme. Abbildung 2-1 zeigt eine der verwendeten Proben. Die Abmessungen

¹ Beide Erstautoren sind genannt, da dies die Publikation ist, auf der große Teile der Promotion beruhen.

2 Methodik

der untersuchten rechtsatrialen Gewebeproben betragen je nach Patient:in 1-2 cm *
0,5-2 cm.



Abbildung 2-1: Herzohrprobe vor Präparation der Muskelstreifen

Exemplarisch sind zwei Mm. pectinati mit einem Stern () hervorgehoben.*

2.2 Gewebeprotektion

Bei der zum Schutz des Gewebes während des Transports und der Probenpräparation verwendeten, auf 4 °C gekühlten kardioplegen Lösung handelte es sich um eine nach Voigt et al. adaptierte Lösung (Voigt et al., 2013). Sie enthielt: 100 mM NaCl, 10 mM KCl, 1,2 mM KH_2PO_4 , 5 mM MgSO_4 , 5 mM MOPS, 50 mM Taurine, 20 mM Glucose und 30 mM 2,3-Butandion-Monoxim (BDM). Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt.

BDM ist eine unspezifische, chemische Phosphatase, welche ursprünglich zur Behandlung von Organophosphat-Intoxikationen entwickelt wurde (Louch et al., 2011; Watanabe et al., 2001). Darüber hinaus ist BDM jedoch auch ein konzentrationsabhängiger, reversibler Inhibitor der Myosin-ATPase, wodurch die Bildung von Querbrückenzyklus-Verbindungen zwischen Aktin und Myosin verhindert wird (Louch et al., 2011; Mulieri et al., 1989; Perreault et al., 1992). BDM vermindert zudem die Menge an aus dem SR freigesetztem intrazellulärem Ca^{2+} (Fryer et al., 1988; Gwathmey et al., 1991).

Durch die oben genannten Effekte ist bei einer Konzentration von 30 mM BDM die mechanische Kontraktion des Muskels komplett blockiert; ein Ca^{2+} -Transient ist jedoch weiterhin nachweisbar. Dementsprechend verursacht BDM eine Dissoziation

2 Methodik

zwischen muskulärer Kontraktion und Ca^{2+} -Transient, was Perreault et al. zufolge vor allem auf die Veränderung der Calcium Sensitivität der Myofilamente und der Kapazität zur Bildung von Querbrücken zurückzuführen ist (Mulieri et al., 1989; Perreault et al., 1992). Trotz dieses Einflusses auf die Kraftentwicklung und Kontraktilität der Kardiomyozyten konnte in einer Studie von Fryer et al. gezeigt werden, dass BDM weder die Amplitude, noch die Geschwindigkeit der Aktionspotentiale beeinflusst (Fryer et al., 1988). Eine Arbeit aus dem Jahr 2001 zeigte jedoch, dass BDM auch einen konzentrationsabhängigen, inhibitorischen Effekt auf den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher-Strom (I_{NCX}) aufweist (Watanabe et al., 2001).

Die obengenannten Effekte von BDM führen zu einer deutlichen Verminderung des myokardialen Energiebedarfs und schützen gleichzeitig vor einer Muskelschädigung während der Präparation von Muskelstreifen aus den Vorhofbiopsien. Insbesondere die in der verwendeten Lösung angewandte Konzentration von 30 mM BDM ist zum Schutz von Myokardproben geeignet, da die mechanische Funktion des Muskels komplett inhibiert wird (Perreault et al., 1992). Es ist in diesem Kontext relevant festzustellen, dass die inhibitorischen Effekte von BDM nach Auswaschen des BDMs vollständig reversibel sind; in einer Methodikstudie konnte nach Anwendung von BDM kein Verlust der entwickelten Kontraktionskraft beobachtet werden (Mulieri et al., 1989).

Der Energiebedarf der Proben wurde weiterhin durch die Verwendung einer auf 4 °C gekühlten Transportlösung und einer hohen Kaliumkonzentration in der Transportlösung vermindert. Eine hyperkaliämische Lösung von in diesem Fall 11,2 mM führt zu einer Änderung des Ruhemembranpotentials der Kardiomyozyten, bei welchem die Myokardzellen dauerhaft depolarisiert und nicht aktivierbar sind und somit einen geringeren Sauerstoff- und Nährstoffbedarf aufweisen (Chambers und Fallouh, 2010; Gay, 1975).

2.3 Transport und Präparation

Nach dem Transport der rechtsatrialen Myokardbiopsien in das Muskelstreifenlabor erfolgte die Präparation der Mm. Pectinati zu sogenannten Muskelstreifen in einer eisgekühlten, frischen kardioplegen BDM-Lösung. Um Druck- oder Zugschäden durch

2 Methodik

Pinzetten an den Muskeln im Rahmen der Präparation zu minimieren, wurden die Herzohrenproben ohne Spannung zwischen zwei Kanülen (Sterican Einmalkanülen, 20/22 G, B. Braun SE, Melsungen, Deutschland) fixiert (siehe Abbildung 2-1). Die Muskelstreifen wurden im Anschluss mithilfe von mikrochirurgischen Pinzetten und Scheren (Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland) vorsichtig aus dem rechten Herzohr herauspräpariert. Ein besonderes Augenmerk lag hierbei darauf, lange und zusammenhängende Muskelstreifen unter minimalem Zug aus dem Gewebe zu präparieren. Dafür wurde das Herzohr zumeist von der chirurgischen Schnittkante aus präpariert und anschließend mit einem Längsschnitt eröffnet, um auch tieferliegende Muskelanteile und Mm. Pectinati atraumatisch aus dem Gewebe zu lösen.

Ausschließlich Muskelstreifen mit einem Durchmesser von $>0,65$ mm wurden für die vorliegende Arbeit verwendet. Zudem wurden generell Präparate mit einem Durchmesser von <1 mm bevorzugt isoliert, da Muskeln mit zunehmendem Durchmesser ein höheres Risiko für Ischämien im Zentrum des Muskels aufweisen (Dashwood et al., 2021; Koch-Weser, 1963; Paradise et al., 1981, Primessnig & Deißler et al., 2022). Die isolierten Muskelstreifen wurden im Anschluss an die Präparation für etwa 10 Minuten in eine weitere, frische und eisgekühlte BDM-Lösung transferiert. Dies diente der Regeneration der Muskeln von dem mechanischen und zellulären Stress der Präparation (Primessnig & Deißler et al., 2022).

Der Rest des Vorhofgewebes wurde nach Abschluss der Präparation der Muskelstreifen für weitere molekularbiologische Analysen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C eingelagert (Primessnig & Deißler et al., 2022).

2.4 Allgemeiner Aufbau der Muskelstreifen-Messstationen

Wie in Abbildung 2-2 dargestellt, konnten die funktionellen Experimente parallel an vier Messstationen durchgeführt werden. Zu diesem Zweck war jede Station mit einem individuellen Computer zur Datenanzeige und Steuerung gekoppelt. Die Messstationen vom Typ „Muscle Station Intact“ wurden von der Firma MyoTronic (Heidelberg, Deutschland) produziert. Eine Übersicht über die verwendeten Materialien findet sich in Tabelle 2-1.

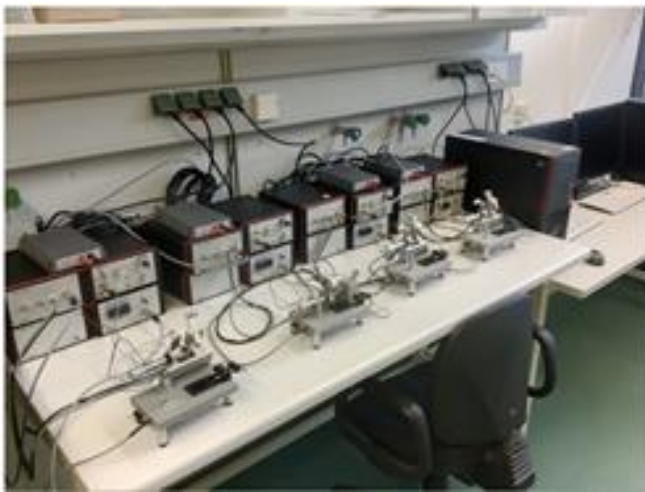


Abbildung 2-2: Übersichtabbildung der Messstation im Muskelstreifenlabor

Tabelle 2-1: Verwendete Versuchsmaterialien

Verwendeten Materialien zur Gewebspräparation und für funktionelle Messungen

Muskelstreifenpräparation

Instrumente/Geräte

mikrochirurgische Pinzette
 mikrochirurgische Schere
 Sterican Einmalkanülen 20/22G
 quadratische Wägeschälchen

Hersteller

Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
 Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
 B. Braun SE, Melsungen, Deutschland
 Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

funktionelle Messungen

Instrumente/Geräte

Muscle Station Intact
 mechanischer Kraftüberträger
 Stimulationsverstärker
 Temperaturkontrolleinheit
 Kraftaufzeichnungseinheit
 Interface (Verbindungseinheit zum jeweiligen PC)
 peristaltische Umwälzpumpe Relogio ICC
 Umwälzpumpenschläuche Tygon LMT-55 mit Stopper
 Umwälzpumpenschläuche Tygon LMT-55 ohne Stopper
 Perfusorenschläuche 150cm
 Schlauch-Konnektoren 1-2 mm
 Edelstahlkanülen
 konische Zentrifugenröhrchen 50 ml
 Zentrifugenröhrchenständer

Hersteller

MyoTronic UG, Heidelberg, Deutschland
 MyoTronic UG, Heidelberg, Deutschland
 MyoTronic UG, Heidelberg, Deutschland
 MyoTronic UG, Heidelberg, Deutschland
 MyoTronic UG, Heidelberg, Deutschland
 MyoTronic UG, Heidelberg, Deutschland
 Ismatec SA, Opfikon, Schweiz
 Saint Gobain S.A., La Defense, Frankreich
 Saint Gobain S.A., La Defense, Frankreich
 B. Braun SE, Melsungen, Deutschland
 neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
 Cadence Science, Cranston, RI, USA
 SPL Life Science Co., Ltd., Naechon-myeon, Korea
 Heathrow Scientific, Vernon Hills, IL, USA

2 Methodik

Im Folgenden werden die Messstationen durch die Abbildungen 2-3 bis 2-5 nochmals im Detail dargestellt werden; eine ausführliche Erklärung folgt im Anschluss.

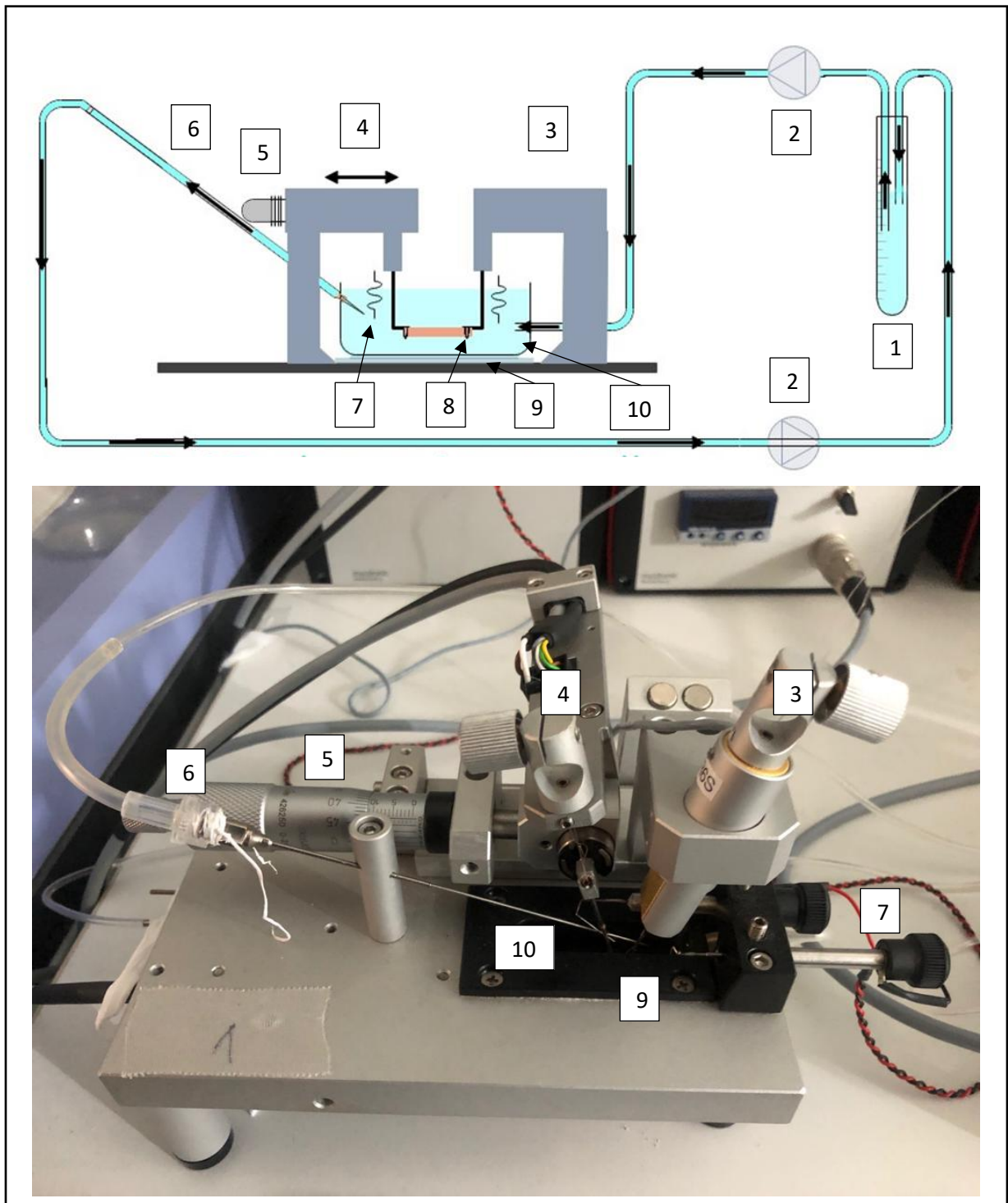


Abbildung 2-3: Aufbau und schematische Darstellung einer Muskelstreifen-Messstation

(1) Zentrifugenröhrchen mit Perfusionsflüssigkeit, (2) peristaltische Pumpen, (3) statischer, mechanischer Kraftaufnehmer, (4) verstellbarer Haken mit (5) Mikrometerschraube, (6) ableitende Kanüle, (7) Elektrode, (8) befestigter Muskelstreifen, (9) Heizplatte, (10) Muskelstreifenbad mit Perfusionslösung

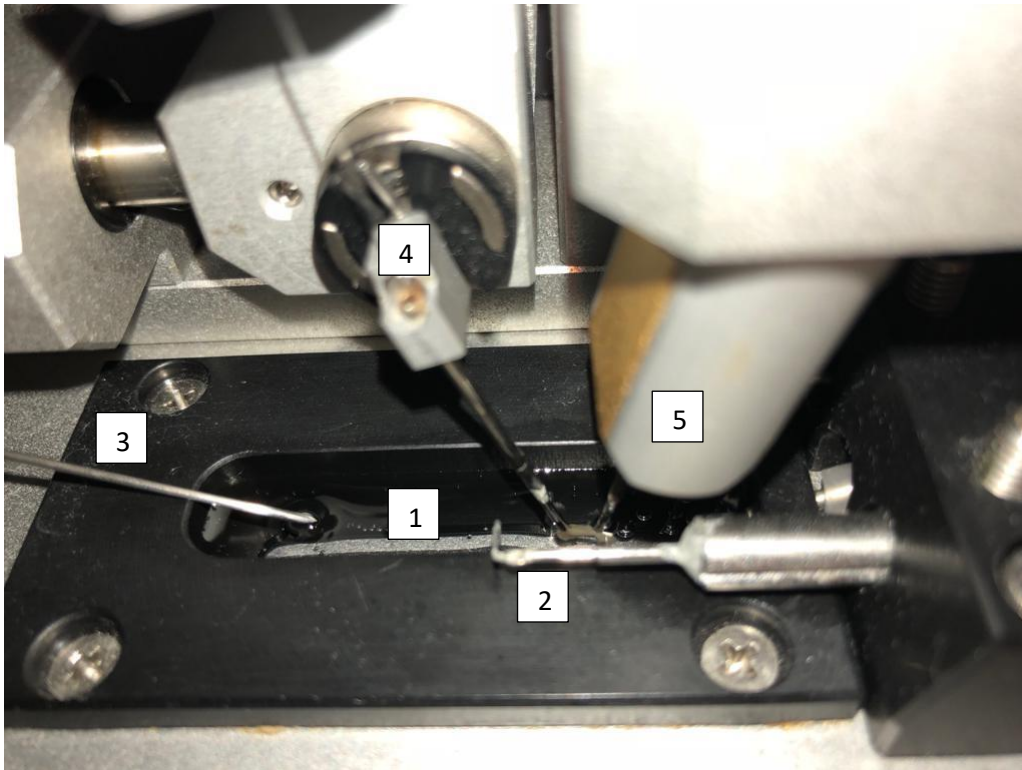


Abbildung 2-4: Nahaufnahme eines Muskelstreifenbads mit mechanischem Kraftaufnehmer

Ein Muskelstreifen ist zwischen den Nadeln eingespannt: (1) Muskelstreifenbad, (2) Elektrode, (3) ableitende Kanüle, (4) verstellbarer Haken mit Mikrometerschraube, (5) mechanischer Kraftaufnehmer



Abbildung 2-5: Nahaufnahme eines Muskelstreifens vor dem Einspannen in den Kraftübertrager auf dem Montageblock in einer BDM-Lösung

2 Methodik

Bei den während den funktionellen Messungen verwendeten Perfusionslösungen handelte es sich um eine angepasste Normaltyrode mit folgender Zusammensetzung: 136 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 20 mM Glucose und initial 0,2 mM CaCl₂ (im Verlauf auf 2,5 mM gesteigert). Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt. Es wurde ein HEPES-gepuffertes System verwendet, um einen möglichst stabilen pH-Wert ohne pH-Wert-Schwankungen während des gesamten Versuchs zu gewährleisten (Wakayama et al., 2005). Insbesondere unphysiologische extrazelluläre Azidosen sollten durch die Pufferung verhindert werden, da sie zu einer Verminderung der Kontraktionskraft der Muskelpräparate führen können (Orchard und Kentish, 1990). Die Pufferkapazität von HEPES mit einem Bereich von pH=6,8-8,2 erlaubte jedoch in diesem Fall eine stabile und kontinuierliche pH-Wert-Einstellung auf pH= 7,4 (Sigma-Aldrich, 2020).

Jede Messstation verfügte über einen separaten, durch peristaltische Pumpen angetriebenen, Tyrode-Kreislauf mit 50 ml (siehe Abschnitt 2.7 *Protokolle* für Details) zirkulierender Lösung pro Muskelstreifen. Die Tyrode wurde dabei aus dem Vorratsbehältnis, einem 50 ml fassenden konischen Zentrifugenröhrchen, in das Muskelstreifenbad (4,5x1x1 cm) gepumpt; durch eine Kanüle wurde gleichzeitig der Tyrode-Überstand des Muskelstreifenbads abgesaugt und wieder zurück in das Vorratsbehältnis befördert (siehe auch Abbildung 2-3 und 2-4). Die Pumpen zirkulierten die Tyrode mit einer Frequenz von 70 bis 100 Umdrehungen pro Minute, was bei einem Schlauchinnendurchmesser von 1,02 mm einem Austauschvolumen von 4,41 bis 6,3 ml pro Minute entsprach. Die Tyrode des Muskelstreifenbad wurde folglich im Mittel mindestens im Minutenintervall vollständig ausgetauscht.

Das Muskelstreifenbad wurde durch eine das Bad von außen umfassende Heizplatte auf eine Temperatur von 36,5 bis 37,0 °C (entsprechend der physiologischen Körpertemperatur) erhitzt und konstant in diesem Temperaturbereich belassen (siehe Abbildung 2-3). Auch die zugeführte Tyrode aus dem Vorratsgefäß wurde vor dem Eintritt in das Muskelstreifenbad an dieser Heizplatte vorbeigeführt, so dass die Lösung bereits an dieser Stelle auf eine Temperatur von 36,5 bis 37,0 °C erhitzt wurde. Die Temperatur des Bades wurde vor Beginn jeder Messreihe mit einem Sondenthermometer kontrolliert und kontinuierlich überwacht.

2 Methodik

Die Enden des mechanischen Kraftaufnehmers und des langenverstellbaren Hakens (siehe Markierung 4 und 5 in Abbildung 2-4) ragten während der Messung jeweils in das Muskelstreifenbad hinein. An diesen Haken waren Fixierungsschlaufen aus Nylon angebracht, durch welche der Muskelstreifen mittels Umschlingung fixiert werden konnte. Da der Abstand zwischen Kraftaufnehmer und langenverstellbarem Haken während der Messprotokolle nicht mehr variiert wurde, fanden die Versuche unter annährend isometrischen Kontraktionsbedingungen statt. Die Elektroden der Messstation wurden so arrangiert, dass sie den Muskelstreifen nicht berührten und an jeweils einem Ende des Muskelstreifens neben den Haken platziert waren, um eine optimale Stimulation zu gewährleisten. Der Kraftaufnehmer übertrug das Signal jedes einzelnen Muskelkontraktionszyklus über ein Interface an den jeweiligen Computer, an dem diese Kontraktionen im Programm MyoDat (Version 2020, MyoTronic UG, Heidelberg, Deutschland) angezeigt und abgespeichert wurden.

2.5 Allgemeiner Versuchsablauf

Nach der Präparation der Muskelstreifen und der nachfolgenden Ruhephase wurden die Muskelstreifen einzeln in die Schlingen des Kraftaufnehmers eingespannt. Dies fand unter Zuhilfenahme des Montageblocks (siehe Abbildung 2-5) statt. Die Muskelstreifen waren während der höchstens 45 bis 60 Sekunden dauernden Montage im Kraftaufnehmer kontinuierlich von einer kardioplegen Lösung bedeckt. Direkt nach dem erfolgreichen Einspannen wurden die Muskelstreifen in das Muskelstreifenbad mit der vorgewärmten Normaltyrode eingetaucht und die Aufzeichnung der Messung im Programm MyoDat wurde gestartet. Im Rahmen dessen wurde auch die diastolische Spannung genullt. Die Tyrode wurde bereits vor Beginn der Messungen im System zirkuliert, um das System zu entlufte und um die Tyrode auf eine Temperatur von 36,5 bis 37,0 °C vorzuwärmen. Die initiale Ca^{2+} -Konzentration von 0,2 mM wurde nach dem Eintauchen der Muskelstreifen in den folgenden 10 Minuten schrittweise auf die finale Ca^{2+} -Konzentration von 2,5 mM erhöhet (Primessnig & Deißler et al., 2022; Wen et al., 2021).

Im Anschluss an das Erreichen der finalen Ca^{2+} -Konzentration (ca. 11 Minuten nach Beginn der Messung) wurden die Muskelstreifen mit einer Frequenz von 1 Hz bei einem Rechtecksignal von 5 ms Dauer und 1 V Spannung stimuliert (Primessnig &

2 Methodik

Deißler et al., 2022, Wen et al., 2021). Die Spannung wurde bei ausbleibender Kontraktion in Schritten von 1 bis 2 V weiter erhöht, bis eine klare Muskelkontraktion sichtbar wurde. Daraufhin wurde die Spannung um weitere 20 % erhöht und für den Verlauf des Experiments bei dieser Spannung belassen (Primessnig & Deißler et al., 2022, Wen et al., 2021). Falls es vor Erreichen der stabilen Ausgangslage (Baseline/Steady State) zu Arrhythmien (Definition siehe Kapitel 2.8 *Auswertung der Muskelstreifen*) kam, wurde die Stimulationsfrequenz gegebenenfalls einmalig um 5 V erhöht. Falls durch diesen Rhythmisierungsversuch die Arrhythmie nicht beendet wurde, wurde der Muskelstreifen verworfen und von der Messung und weiteren Analysen ausgeschlossen. Regulär betrug die Stimulationsspannung in den verwendeten Messanlagen zwischen 4 V und 9 V.

Nach dem Beginn der Stimulation wurde zunächst eine Stabilisierung der entwickelten Kontraktionskraft abgewartet. Daraufhin wurden die Muskelstreifen alle 2 Minuten um 0,02 mm gedehnt. Dies wurde so lange fortgesetzt, bis durch die Dehnung keine weitere Kraftzunahme mehr festzustellen war. Dies wurde als der Punkt der maximalen Vordehnung (L_{max}) definiert, an dem stabile Versuchsbedingungen als Grundlage für die weiteren Interventionen gegeben waren. In dieser Steady-State-Phase wurde zunächst eine 10-minütige „Baseline-Messung“ durchgeführt, um für die folgenden Interventionen/ Messungen Vergleichswerte zu generieren. Ein beispielhafter Versuchsablauf mit markierten Versuchsphasen ist in Abbildung 2-6 dargestellt.

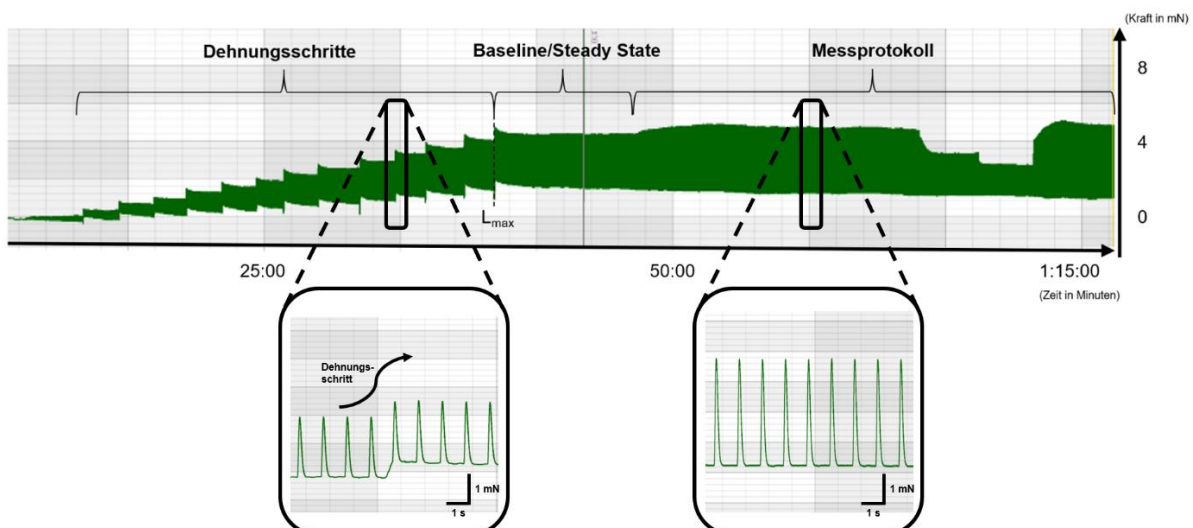


Abbildung 2-6: Darstellung eines typischen Versuchsablaufs mit dem verwendeten MyoTronic System

Gesamte Messung vom 24.01.2019 (Kennnummer S3V1); zur besseren Übersicht sind ein Dehnungsschritt (links unten im Bild) und eine typische Schlagabfolge nach pharmakologischer Intervention (rechts unten im Bild) vergrößert abgebildet.

2.6 Pharmakologische Interventionen und Lösungsmittel

2.6.1 Isoproterenol (ISO)

Isoproterenol (syn. *Isoprenalin*; Kurzform *ISO*) ist synthetisches Katecholamin und ein nicht-selektiver β -AR-Agonist mit konzentrationsabhängiger Wirkung (Ahlquist, 1973; Duker und Vaughan Williams, 1984). In einer Publikation von Negroni et al. konnte gezeigt werden, dass bei einer ISO-Konzentration von 20 nM die meisten der PKA-abhängigen Bindungsstellen zu etwa 50 % besetzt sind (Negroni et al., 2015). Dies konnte im Rahmen der Vorversuche dieser Arbeit funktionell nachvollzogen werden (siehe 3.1 Vorversuche). Da in der vorliegenden Arbeit der modulatorische Effekt von BNP bzw. LBQ657/Valsartan auf die atriale Inotropie und Arrhythmogenese unter ISO-Behandlung untersucht werden sollte, wurde aufbauend auf diesen Erkenntnissen für die Versuche eine ISO-Konzentration von 20 nM gewählt. So wurde sichergestellt, dass der modulatorische Effekt der verwendeten Substanzen nicht durch eine maximale β -AR-Stimulation mittels ISO maskiert wurde (Primessnig & Deißler et al., 2022).

Für die ISO-Stammlösung wurde Isoproterenol-Hydrochlorid (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) mit einer molaren Masse von 247,72 g/Mol mit einer Konzentration von 1 mM in destilliertem Wasser gelöst. Diese Lösung wurde in Tagesdosen aliquotiert und bei -20 °C gelagert. An jedem Versuchstag wurde eine frische Stammlösung verwendet.

2.6.2 Humanes BNP

Humanes BNP ist ein aus 32 Aminosäuren bestehendes Peptid-Hormon, welches durch Bindung an die NP-Rezeptoren seine Wirkung am Myokard entfaltet. Es hat ein Molekulargewicht von 3464,04 g/Mol und wurde entsprechend der Herstellerangaben (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) in destilliertem Wasser gelöst, in Tagesdosen aliquotiert und bei -20 °C gelagert; die BNP-Konzentration in der verwendeten Stammlösung betrug 1 mM. Für jeden Versuchstag wurde eine frische Stammlösung verwendet.

In einer Arbeit von Guo et al. wurde ein dosisabhängiger, gefäßrelaxierender Effekt von BNP festgestellt, welcher bei einer Konzentration von 100 nM am stärksten ausgeprägt war (Guo et al., 2015). Zudem wurde in einer Arbeit von Perera et al., welche den Effekt von ANP auf die myokardiale Kontraktilität unter ISO untersuchte,

ebenfalls eine Konzentration von 100 nM des NPs ANP gewählt (Perera et al., 2015). In den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten zur Wirkung von BNP wurde an diese Publikationen angelehnt eine Konzentration von 100 nM BNP verwendet (Primessnig & Deißler et al., 2022).

2.6.3 Sacubitrilat (LBQ657)

Bei Sacubitrilat (LBQ657) handelt es sich um den pharmakologisch aktiven Metaboliten von Sacubitril, welcher physiologisch durch eine Hydrolyse unter Beteiligung der Carboxylesterase 1 in der Leber entsteht (Shi et al., 2016). LBQ657 hat ein Molekulargewicht von 383,44 g/Mol. In mehreren Pharmakokinetikstudien wurde die Plasmakonzentration von LBQ657 im Menschen untersucht, welche bei einer Dosis von 200 mg (entsprechend der aktuell zugelassenen maximalen Einzeldosis von Entresto®) ihr Maximum bei 8529 ng/ml (Gu et al., 2010) und 8482 ng/ml (Akahori et al., 2017) hatte. Für die Versuche mit LBQ657 wurde auf diesen Erkenntnissen aufbauend eine Konzentration von 8500 ng/ml LBQ657 verwendet (Primessnig & Deißler et al., 2022).

LBQ657 wurde den Herstellerangaben entsprechend (Novartis, Basel, Schweiz und Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) in einer Konzentration von 2mg/ml in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Für jeden Versuchstag wurde eine neue Stammlösung verwendet.

2.6.4 Valsartan

Valsartan ist ein AT₁-Rezeptor-Antagonist, welcher in dem Präparat Entresto® (Sacubitril/Valsartan; LCZ969) als Teil der Fixkombination enthalten ist. Die molare Masse von Valsartan beträgt 435,52 g/Mol. In den beiden oben genannten Pharmakokinetikstudien wurden ebenfalls die maximalen Konzentrationen von Valsartan im Plasma untersucht, welche bei einer Entresto®-Dosis von 200 mg 3990 ng/ml (Gu et al., 2010) und 3981,2 ng/ml (Akahori et al., 2017) betragen. Für die Versuche mit Valsartan wurde entsprechend dieser Ergebnisse eine Konzentration von 4000 ng/ml festgelegt (Primessnig & Deißler et al., 2022).

Zur Herstellung der Stammlösung wurden 20 mg Valsartan (Novartis, Basel, Schweiz) jeweils in einem Milliliter DMSO gelöst, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Für jeden Versuchstag wurde eine neue Stammlösung verwendet.

2.7 Übersicht der verwendeten funktionellen Messprotokolle

2.7.1 Vorversuch - Frequenzprotokoll

In einer kleinen Subgruppe von Muskelstreifen wurde der Effekt einer Variation der Stimulationsfrequenz auf kontraktile Funktionsparameter untersucht. Nach einer 10-minütigen Baseline-Messung wurde dazu die Stimulationsfrequenz für 5 Minuten zunächst auf 0,5 Hz abgesenkt, dann je 5 Minuten auf 1, 2 und 3 Hz erhöht und schließlich wieder auf 0,5 Hz reduziert. In der untenstehenden Abbildung ist ein schematischer Ablauf des Protokolls dargestellt (Abbildung 2-7). Insgesamt dauerte der Versuch 35 Minuten.

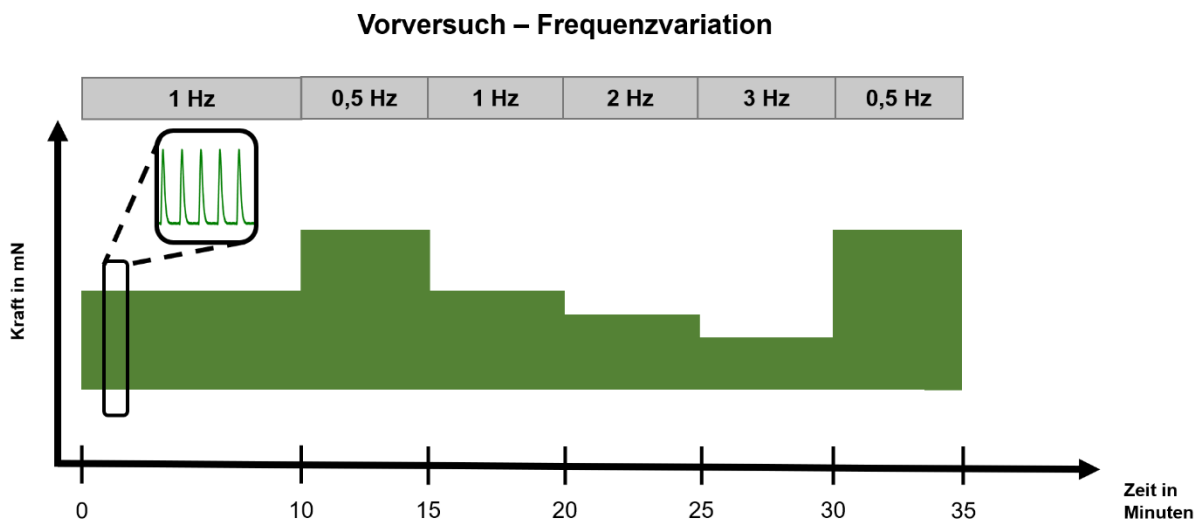


Abbildung 2-7: Schematischer Versuchsablauf des Vorversuchs zur Untersuchung der Frequenzvariation

Links in der Abbildung (schwarzer Rahmen) sind zur besseren Übersicht einzelne Kontraktionen dargestellt. Die grüne Fläche zeigt entsprechend die gestauchte Abbildung einzelner Kontraktionen.

2.7.2 Vorversuch - ISO-Konzentrationskurve (Dosis-Wirkungs-Beziehung)

Zur Verifizierung der dosisabhängigen Wirkung von ISO wurde die ISO-Konzentration in der Perfusionslösung der Muskelstreifen nach einer 10-minütigen Baseline-Messung alle 8 Minuten angehoben. Die Messung wurde mit einer Initialkonzentration von 20 nM ISO begonnen und im Verlauf des Protokolls auf 50 nM, 100 nM, 200 nM und schließlich 300 nM angehoben (siehe auch Abbildung 2-8). Die Gesamtversuchsdauer dieser Validierungsmessung betrug 50 Minuten.

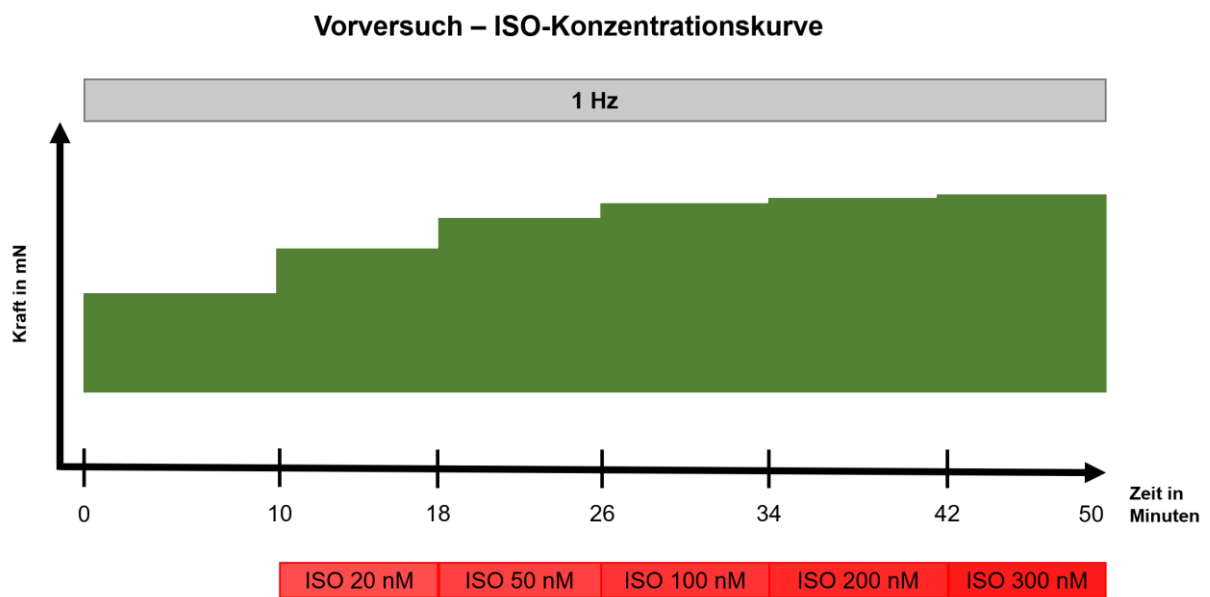


Abbildung 2-8: Schematischer Versuchsablauf des Vorversuchs zur Untersuchung der Dosis-Wirkungs-Beziehung von ISO

ISO: Isoproterenol

2.7.3 Protokoll 1 (Langzeitprotokoll) – ISO \pm BNP

Zur Untersuchung eines potenziellen *zeitabhängigen* Effekts von BNP auf die systolische Kraftentwicklung, diastolische Spannung und Entwicklung von Arrhythmien unter ISO-Behandlung wurden die Muskelstreifen nach Erreichen der maximalen Vordehnung in zwei Gruppen randomisiert. Die Kontrollgruppe wurde in diesem Protokoll nach der 10-minütigen Baseline-Messung lediglich mit 20 nM ISO behandelt, während die Interventionsgruppe 10 Minuten nach der initialen ISO-Gabe zusätzlich mit 100 nM BNP behandelt wurde. Insgesamt wurden die Muskelstreifen über einen Zeitraum von 70 Minuten untersucht, um auch potenzielle längerfristige Effekte von BNP auf die Muskelpräparate zu untersuchen. Die Stimulation erfolgte durchgängig mit einer Frequenz von 1 Hz. Eine Übersicht über das verwendete Protokoll findet sich in Abbildung 2-9.

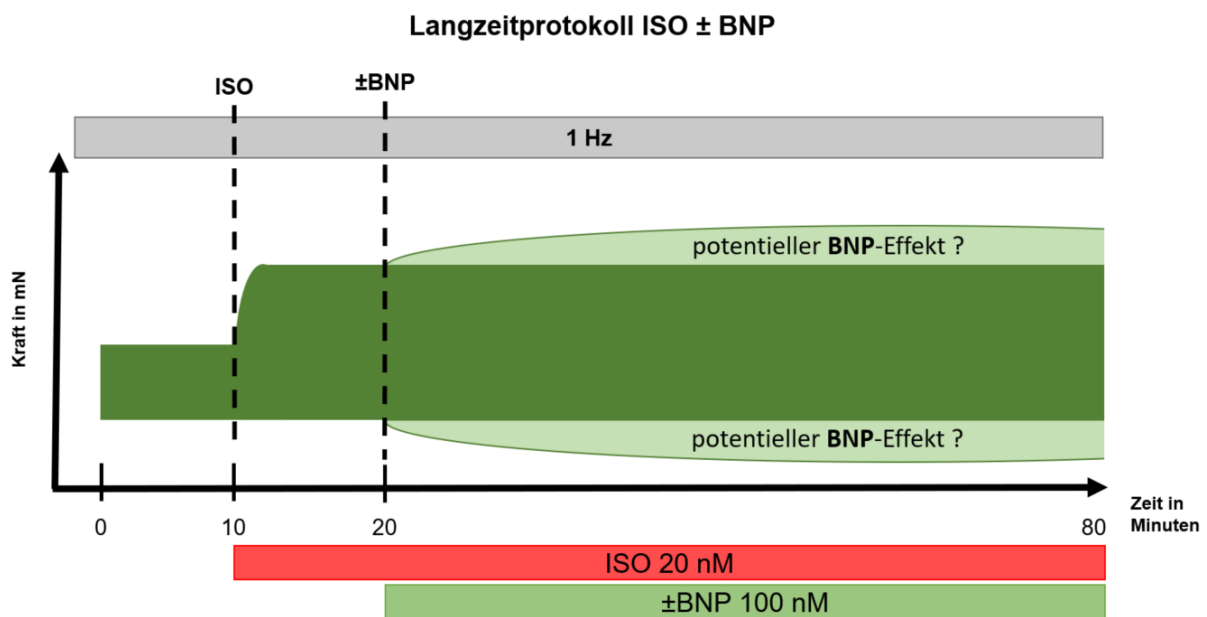


Abbildung 2-9: Schematischer Versuchsablauf des Langzeitprotokolls mit ISO \pm BNP

In hellgrün sind die im Rahmen der Arbeit zu untersuchenden, potenziellen (makroskopischen) Effekte einer Behandlung mit BNP auf die Kontraktionskurve hervorgehoben.

ISO: Isoproterenol, BNP: Brain Natriuretic Peptide

2.7.4 Protokoll 2 (Frequenzprotokoll) – ISO \pm BNP

Zur Untersuchung eines potenziellen *frequenzabhängigen* Effekts von BNP auf die systolische Kraftentwicklung, diastolische Spannung und Entwicklung von Arrhythmien unter ISO-Behandlung wurden die Muskelstreifen in diesem Protokoll nach Erreichen der maximalen Vordehnung ebenfalls in zwei Gruppen randomisiert. Während die Kontrollgruppe nach der Baseline-Messung mit 20 nM ISO behandelt wurde, wurden in der Interventionsgruppe 10 Minuten nach der initialen ISO-Gabe 100 nM BNP zur Perfusionslösung hinzugegeben. Nach der Zugabe von ISO und ggf. BNP wurde die Stimulationsfrequenz zunächst für je 5 Minuten auf 2 Hz und 3 Hz erhöht und im Anschluss für weitere 5 Minuten auf 0,5 Hz abgesenkt. Insgesamt wurden die Muskelstreifen über einen Zeitraum von etwa 45 Minuten untersucht. Eine beispielhafte Übersicht über das verwendete Protokoll findet sich in Abbildung 2-10.

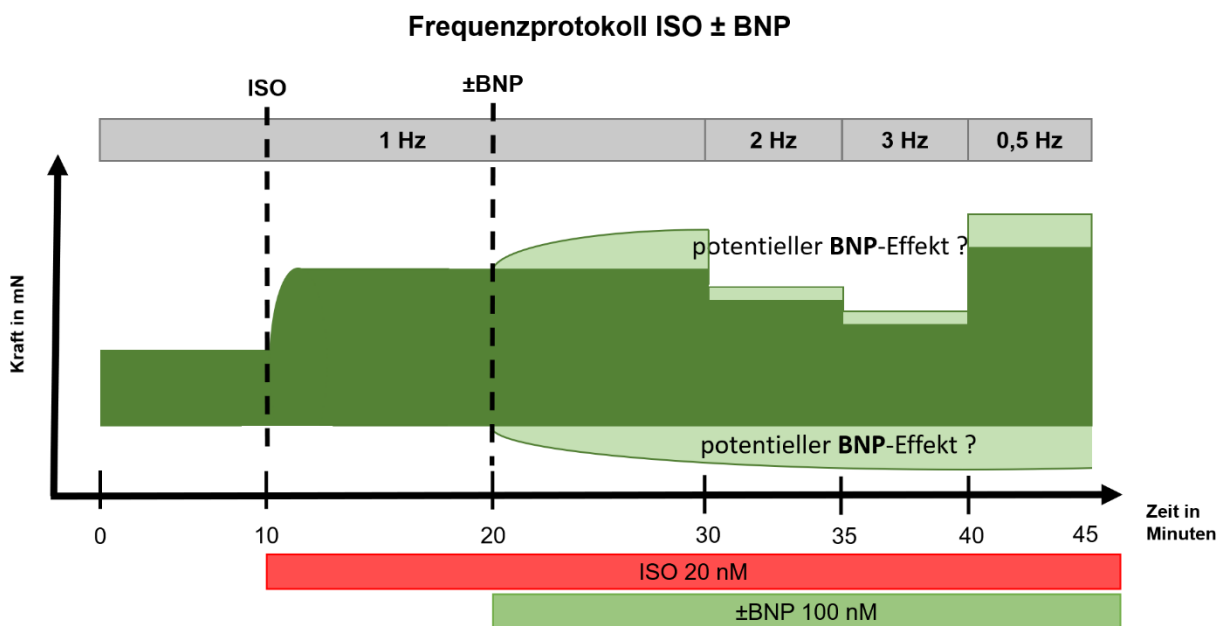


Abbildung 2-10: Schematischer Versuchsablauf des Frequenzprotokolls mit ISO \pm BNP

In hellgrün sind die im Rahmen der Arbeit zu untersuchenden, potenziellen (makroskopischen) Effekte einer Behandlung mit BNP auf die Kontraktionskurve hervorgehoben.

ISO: Isoproterenol, BNP: Brain Natriuretic Peptide

2.7.5 Protokoll 3 (Frequenzprotokoll) – ISO ± LBQ657

Die Effekte von LBQ657 auf die atriale Funktion und Arrhythmogenese unter ISO-Behandlung wurden ebenfalls in einem Frequenzprotokoll untersucht. Dafür wurden die Muskelstreifen nach der Präparation und Ruhephase randomisiert und für jeweils 60 Minuten entweder mit dem Vehikel DMSO (Kontrollgruppe) oder mit LBQ657 (Interventionsgruppe) bei etwa 4 °C in einer BDM-Lösung präinkubiert. Im Anschluss wurden die Muskelstreifen in der Messanlage verankert. Die Konzentration des Vehikels oder des Medikaments in der während der folgenden Messungen verwendeten Perfusionslösung entsprach der bereits bei der Präinkubation verwendeten Konzentration, um einen Abfall der Wirkung während der Messungen zu vermeiden. Nach der Vordehnung der Muskelstreifen (bis zum Erreichen der L_{max}) und der 10-minütigen Baseline-Messung bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz wurden analog zu den vorherigen Protokollen 20 nM ISO zur Perfusionslösung hinzugegeben. Nach einer 20-minütigen Messphase bei 1 Hz Stimulationsfrequenz wurde die Frequenz dann für je 5 Minuten auf 2 Hz und 3 Hz erhöht und im Anschluss für weitere 5 Minuten auf 0,5 Hz abgesenkt. In diesem Protokoll wurden die Muskelstreifen ebenfalls für insgesamt 45 Minuten beobachtet (siehe Abbildung 2-11).

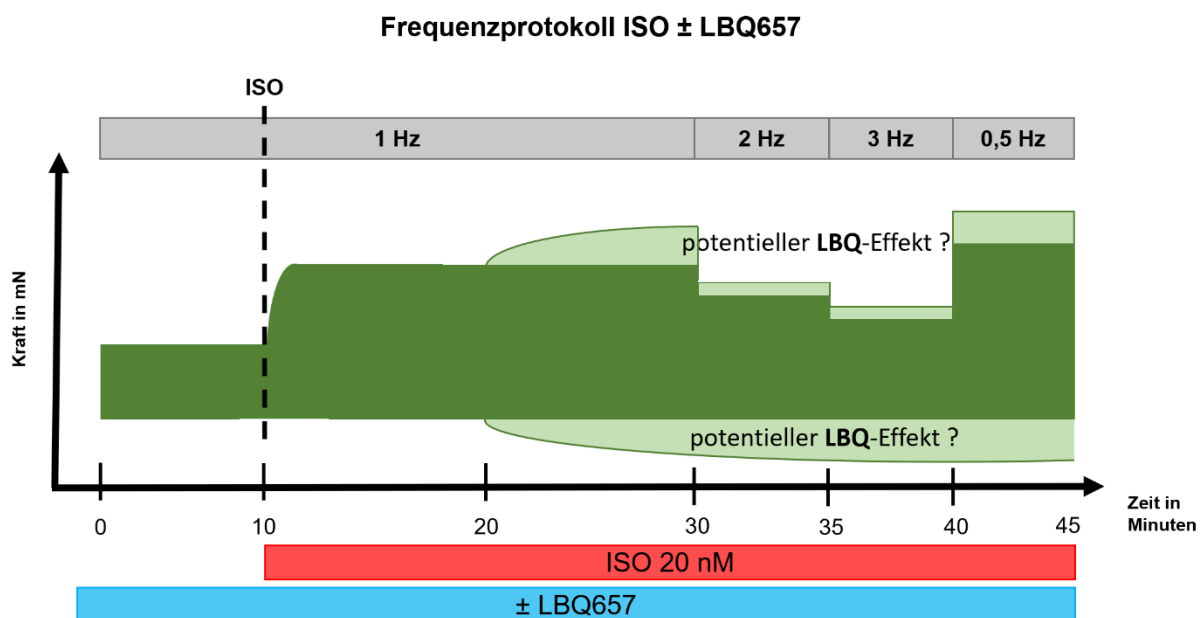


Abbildung 2-11: Schematischer Versuchsablauf des Frequenzprotokolls mit ISO ± LBQ657

In hellgrün sind die im Rahmen der Arbeit zu untersuchenden, potenziellen (makroskopischen) Effekte einer Behandlung mit LBQ657 auf die Kontraktionskurve hervorgehoben

ISO: Isoproterenol, LBQ657/LBQ: Sacubitrilat

2.7.6 Protokoll 4 (Frequenzprotokoll) – ISO ± LBQ657/Valsartan

Das zur Untersuchung der frequenzabhängigen Effekte von LBQ657/Valsartan verwendete Messprotokoll entspricht in Ablauf und Zeitdauer dem Protokoll, welches die Wirkung von ausschließlich LBQ657 untersuchte (Abschnitt 2.7.5, Abbildung 2-11). Anstelle von lediglich LBQ657 wurde jedoch eine Kombination aus LBQ657 und Valsartan zur Präinkubationslösung und zur Perfusionslösung hinzugegeben. Ein beispielhafter Versuchsablauf ist in Abbildung 2-12 zu finden.

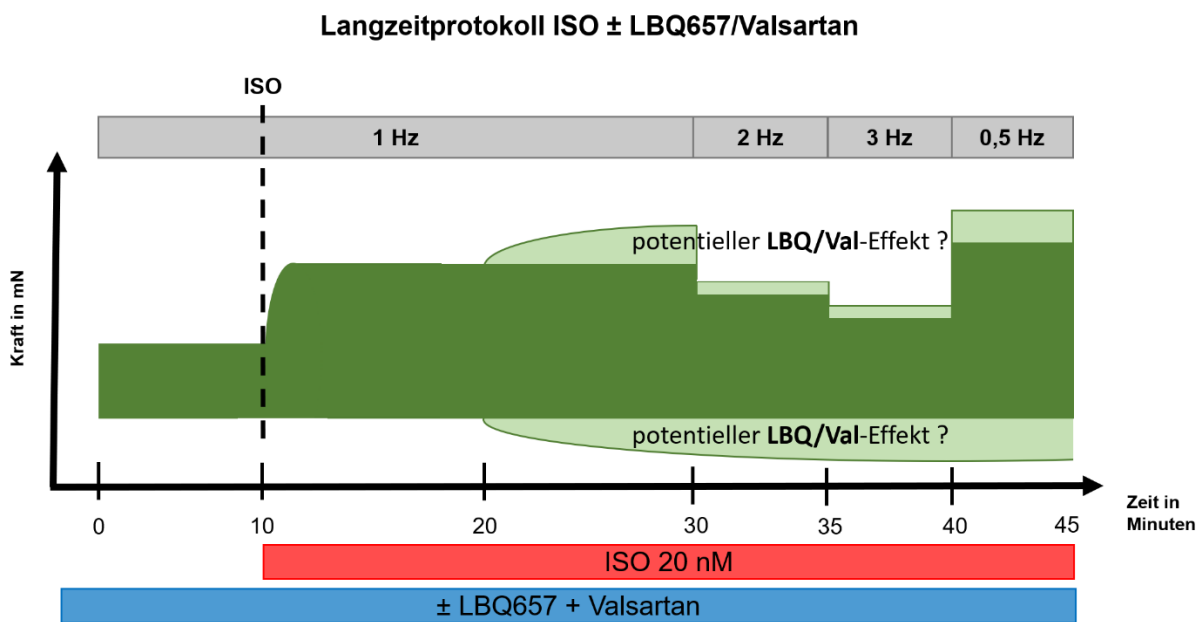


Abbildung 2-12: Schematischer Versuchsablauf des Frequenzprotokolls mit ISO ± LBQ657/Valsartan

In hellgrün sind die im Rahmen der Arbeit zu untersuchenden, potenziellen (makroskopischen) Effekte einer Behandlung mit LBQ657/Valsartan auf die Kontraktionskurve hervorgehoben

ISO: Isoproterenol, LBQ657/LBQ: Sacubitrilat, Val: Valsartan

2.8 Auswertung der Muskelstreifenanalysen

Die Erfassung der Daten erfolgte digital mit dem von MyoTronic bereitgestellten Programm MyoDat (Version 2020); die Sampling Rate betrug 1000 Hz. Im Anschluss an die Messungen wurden die generierten Dateien mit dem ebenfalls von MyoTronic bereitgestellten Programm MyoViewer analysiert. Zur Analyse der funktionellen Parameter der Muskelstreifen wurden im Normalfall (ohne Arrhythmien) jeweils 30 aufeinanderfolgende Schläge am Ende des untersuchten Zeitraums vermessen; der Durchschnitt dieser 30 Schläge wurde dann als Parameter in die statistische Analyse eingepflegt. Bei den analysierten Parametern handelte es sich um die entwickelte Kraft (in mN), die diastolische Spannung (in mN), die Half Time to Peak (*HTTP*), die Time to Peak (*TTP*), die Full Width at Half Maximum (*FWHM*), die Half Relaxation Time (*HRT*) und die Relaxationskonstante (τ). Die zeitgebundenen Parameter wurden jeweils in Sekunden errechnet. Zur Berechnung der Relaxationskonstante τ wurde ein monoexponentieller Fit der letzten 50 % der Relaxationskurve vorgenommen. Um eine bessere Vergleichbarkeit der entwickelten systolische Kraft und der diastolischen Spannung einzelner Muskelstreifen zu gewährleisten, wurde, wann immer vorhanden, eine Normalisierung auf die Querschnittsfläche der Muskelstreifen vorgenommen.

Arrhythmien wurden händisch anhand folgender zuvor festgelegter Kriterien ausgewertet. Zwischenkontraktionen und deformierende Kontraktionen wurden gleichwertig als Arrhythmien bewertet (siehe Abbildung 2-13 für Beispiele).

- *Zwischenkontraktionen*: Abweichungen von $>5\%$ der Kontraktionsamplitude im Zeitintervall zwischen zwei Schlägen. Bei einer Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz wurden bei der besseren Beurteilbarkeit des Intervalls zwischen zwei Schlägen auch sicher abgrenzbare Abweichungen $<5\%$ der Kontraktionsamplitude als Arrhythmie bewertet.
- *Deformierte Kontraktionen*: deformierende Vor- oder Nachkontraktion sowie deutliche Einschränkungen der Relaxation mit Übergang in eine neue Kontraktion.

In der Datenanalyse wurden alle Muskelstreifen berücksichtigt, die einer Kontroll- oder Interventionsgruppe zugeteilt wurden. Bei höhergradigen Arrhythmien waren einzelne Funktionsparameter nicht sicher zu erheben (bspw. die entwickelte systolische Kraft

2 Methodik

oder die HRT). In diesem Fall wurde der Muskelstreifen mit allen sicher bestimmbar Daten und den Informationen zur Arrhythmie trotzdem in die Analyse aufgenommen, um eine Beeinflussung der Messergebnisse durch Selektion zu verhindern. Bei einer technisch bedingten Unterbrechungen der Messung (bspw. durch Malfunktion der Elektroden) wurden die Muskelstreifen von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

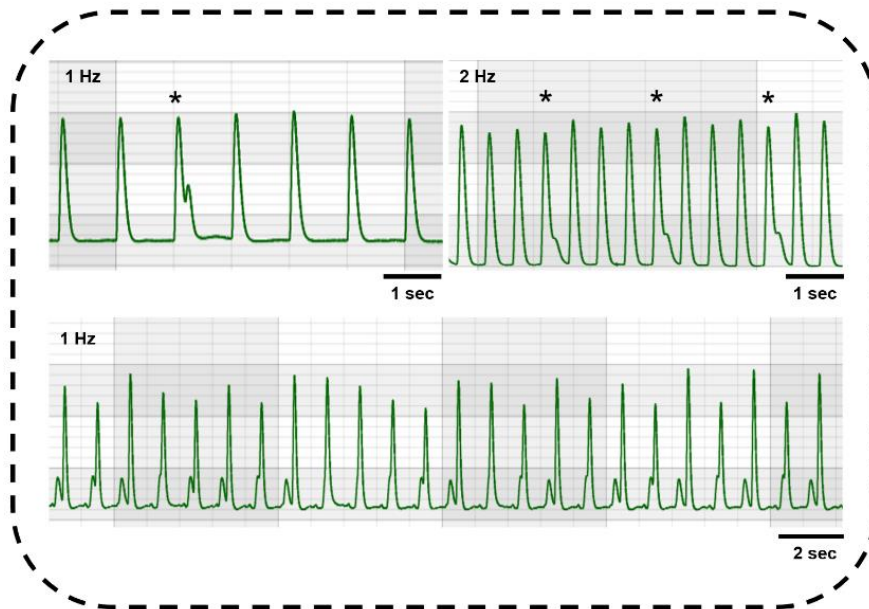


Abbildung 2-13: Beispielabbildungen für Arrhythmien im Verlauf der Messungen

In den oberen beiden Teilabbildungen markiert ein () einzelne arrhythmische Schläge. Die untere Teilabbildung zeigt einen Muskel mit totaler Arrhythmie.*

2.9 Molekularbiologische Untersuchungen

Die Probenextraktionen und Messungen wurden gemeinsam mit Frau Dr. Paulina Wakula entsprechend den Herstellervorgaben durchgeführt. Zur Analyse der NEP-Expression wurden Proben von Patient:innen mit terminaler Herzinsuffizienz über die DHZB Biobank akquiriert. Ein entsprechendes Ethikvotum (EA4/028/12) zur Nutzung der Proben liegt vor und entspricht den ethischen Grundsätzen der Deklaration von Helsinki. Alle Patient:innen waren volljährig und willigten schriftlich in die Entnahme einer Biopsie und die Erfassung klinischer und anamnestischer Informationen ein.

2.9.1 Neprilysin Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Biopsien des rechten Atriums und des linken Ventrikels von N=10 Patient:innen mit terminaler Herzinsuffizienz (genaue Patientencharakteristika siehe Ergebnisteil 3.7.2 Tabelle 3-3 und 3-4) wurden mit Hilfe einer Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) (EHMME, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) auf ihre NEP-Expression untersucht.

Im Folgenden werden die durchgeführten Schritte entsprechend Primessnig & Deißler et al. 2022 kurz wiedergegeben: Die bei -80 °C gelagerten Gewebeproben wurden bei einer Temperatur von 4 °C in einem Lysepuffer mit folgender Zusammensetzung homogenisiert: 20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 137 mM NaCl, 1 % NP 40, 20 mM NaF, 1 mM Natriumdiphosphat, 50 mM β -Glycerophosphat, 10 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 4 μ g/ml Aprotinin, 4 μ g/ml Pepstatin A und 4 μ g/ml Leupeptin. Anschließend wurde das Homogenisat bei 12000 Umdrehungen pro Minute für insgesamt 10 Minuten zentrifugiert, um eventuelle Rückstände zu entfernen. Die Gesamtproteinkonzentration des Überstandes wurde mittels eines Pierce BCA Assays (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) bestimmt. Daraufhin wurden die Proben im Verhältnis von 1:5 verdünnt und in Duplikaten untersucht. Die gemessene Konzentration (ng/ml) wurde auf die Gesamtproteinmenge normalisiert (ng/mg Gesamtprotein) (Primessnig & Deißler et al., 2022).

2.9.2 VASP Western Blot

Bei *VASP* handelt es sich um das Vasodilator-stimulierte Phosphoprotein, dessen Phosphorylierung unter anderem als Surrogatparameter für die Aktivierung der PKG verwendet wird. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen wurden die Muskelstreifen nach Abschluss der funktionellen Messprotokolle in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C für weitere Untersuchungen eingelagert. Muskelstreifen von N=5 Patient:innen, welche entweder mit DMSO oder mit LBQ657/Valsartan behandelt wurden (siehe Abschnitt 2.7.6), wurden verwendet.

Im Folgenden werden die durchgeführten Schritte entsprechend Primessnig & Deißler et al. 2022 kurz wiedergegeben: Die eingelagerten Muskelstreifen wurden zur molekularbiologischen Untersuchung bei 4 °C in einem Lysepuffer mit der folgenden Zusammensetzung homogenisiert: 20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 137 mM NaCl, 10 % Glycerol, 1 % NP 40, 20 mM NaF, 1 mM Natrium Pyrophosphat , 50 mM β -

2 Methodik

Glycerophosphat, 10 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 4 µg/ml Aprotinin, 4 µg/ml Pepstatin A, und 4 µg/ml Leupeptin. Zur Western Blot Untersuchung wurden 35 µg des Gewebshomogenats auf 4 bis 12 % Bis-Tris Polyacrylamid Gel aufgetragen und nach Auftrennung auf Nitrozellulose-Membranen transferiert. Unspezifische Bindungen wurden mit 5 % getrocknetem Milchkpulver, welche in Tris-gepufferter Kochsalzlösung gelöst und mit 0,1 % Tween-20 versetzt wurde, blockiert. Anschließend wurden die Membranen mit anti-Phospho-Serin157 VASP (1/750) oder anti-Phospho-Serin239 (1/500) (beide von Cell Signaling, Danvers, MA, USA) und anti-VASP (1/750) (immunoGlobe, Himmelstadt, Bayern, Deutschland) bei 4 °C über Nacht inkubiert. Mit IRDye 800CW verbundenes anti-Hasen IgG und mit 680RD verbundenes anti-Maus IgG (beide von LI-COR, Lincoln, NE, USA) wurden als sekundäre Antikörper verwendet. Die Signale der jeweiligen Banden wurden schließlich mit dem Odyssey CLx System detektiert, die Bandenintensität wurde mit Hilfe der Image Studio Software (LI-COR, Lincoln, NE, USA) quantifiziert (Primessnig & Deißler et al., 2022).

2.10 Statistische Analyse

Zur statistischen und graphischen Auswertung wurde das Programm GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) in der Version 8.0.1 verwendet. Die Datenanalyse erfolgte analog zur aktuell publizierten Literatur (Eiringhaus et al., 2020). Entsprechend Taylor et al. wurde die diastolische Spannung zu Beginn des Messprotokolls (Baseline) auf 0 mN angeglichen (Taylor et al., 2004). Die Fehlerbalken der den Experimenten zugehörigen Abbildungen geben den Standard Error of Means (*SEM*) an. Eine one-way Analysis of Variance (*ANOVA*) oder two-way *ANOVA*, jeweils mit repeated measures (*RM*), wurden zur Analyse der entwickelten systolischen Kraft, der diastolischen Spannung und der Analyse der kontraktilen Funktionsparameter im Rahmen der Analyse der Kraft-Frequenz-Kopplung verwendet. Als post-hoc Test wurde bei den durchgeführten *ANOVA*-Testverfahren der Sidak Test gewählt. Zum Vergleich zweier Gruppen wurde der zweiseitige t-Test verwendet. Die Analyse der Arrhythmien erfolgte durch den zweiseitigen Chi-Quadrat-Test, unter zusätzlicher Berechnung der Odds-Ratio (*OR*) mittels Baptista-Pike Methode. Zur Auswertung einer möglichen Korrelation wurde entweder der Pearson R oder Spearman R Test verwendet. Alle Analysen wurden unter Verwendung eines zweiseitigen Testverfahrens durchgeführt; ein p Wert von $p < 0,05$ wurde als signifikant erachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Vorversuche

Nachdem die Muskelstreifenanlage in Betrieb genommen wurde, wurde in den Vorversuchen zunächst die Messstabilität der Anlage untersucht. Ein Fokus lag dabei auf der Untersuchung des funktionellen Einflusses einer Frequenzvariation und einer Behandlung mit ISO auf systolische und diastolische Funktionsparameter.

3.1.1 Frequenzprotokoll

In Abbildung 3-1 sind die Kontraktionskurven eines Beispielmuskels und deren Anpassung an veränderte Stimulationsfrequenzen dargestellt. Abbildung 3-2 zeigt die zugehörige statistische Aufbereitung mit Betrachtung der relativen Kraftanpassung (3-2A) und der TTP (3-2B) sowie der Relaxationsparameter HRT (3-2C) und tau (3-2D). Im Rahmen der Variation der Stimulationsfrequenz konnte eine signifikante, frequenzabhängige Veränderung der Kontraktionskraft und der TTP gezeigt werden (siehe 3-2A und 3-2B): Während geringere Stimulationsfrequenzen mit einer höheren trabekulären Kraftentwicklung und einer längeren TTP assoziiert waren (im vorliegenden Protokoll wurde die maximale Kraftentwicklung und TTP bei 0,5 Hz beobachtet), waren höhere Stimulationsfrequenzen mit einem Absinken der entwickelten Kraft und der TTP assoziiert (minimale Kraftentwicklung und TTP im untersuchten Protokoll bei 3 Hz). Für die Relaxationsparameter HRT und tau zeigte sich eine numerische, jedoch nicht signifikante frequenzabhängige Anpassung der Werte (siehe 3-2C und 3-2D).

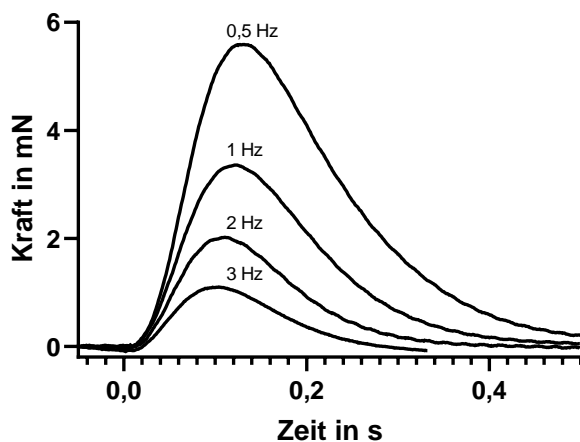


Abbildung 3-1: Beispielabbildung für eine Anpassung der Kontraktionskraft an verschiedene Stimulationsfrequenzen

(Messung vom 27.11.2019; Kennnummer: S1V1)

3 Ergebnisse

Hervorzuheben ist, dass es während der Ausführung des Messprotokolls bei identischen Stimulationsfrequenzen zu keinen signifikanten Unterschieden der Funktionsparameter im zeitlichen Verlauf des Protokolls kam. Sowohl die in einem Abstand von 10 min durchgeführten Messungen bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz als auch die in einem 20 min Abstand durchgeführten Messungen bei 0,5 Hz unterschieden sich in keinem der in Abbildung 3-2 abgebildeten Funktionsparameter signifikant. Somit konnte durch die Vorversuche eine zeitliche Stabilität des verwendeten Messsystems nachgewiesen werden, welche Voraussetzung für die Durchführung der folgenden längeren Protokolle war.

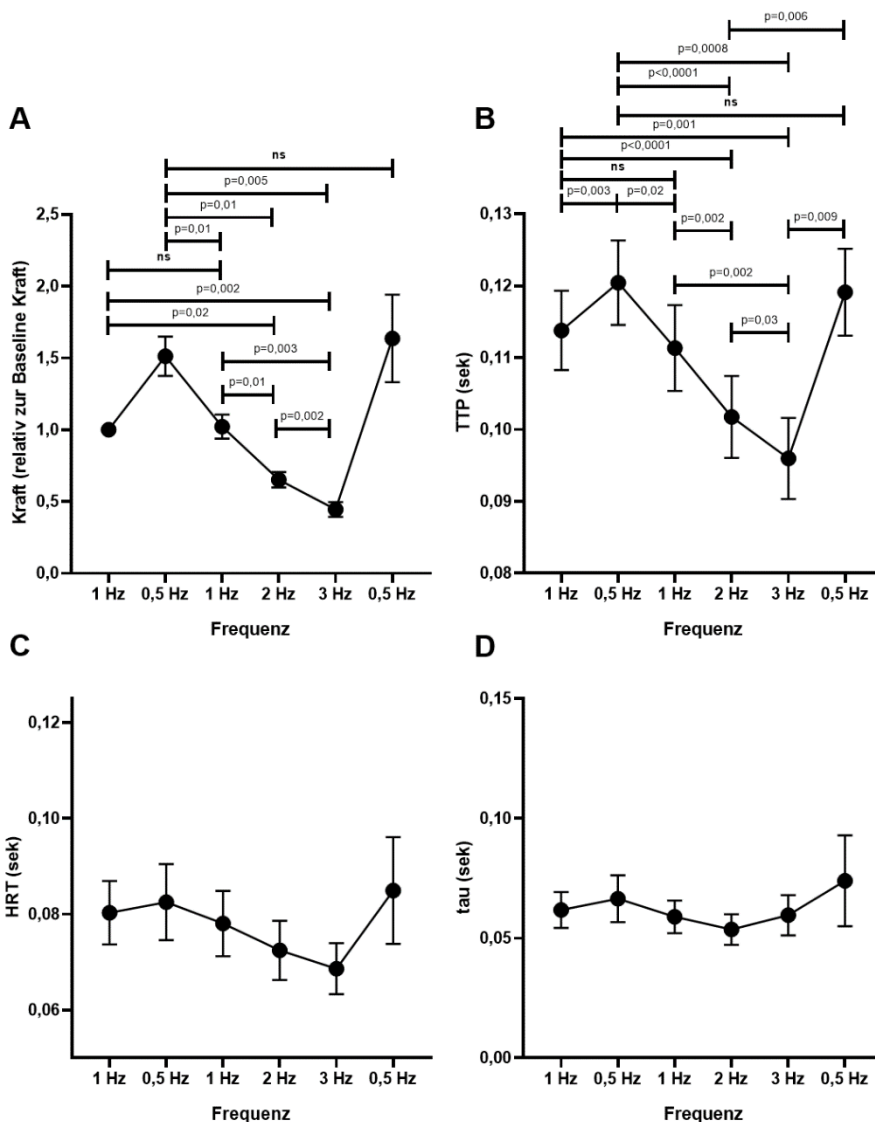


Abbildung 3-2: Frequenzabhängigkeit der atrialen in-vitro Funktion

Bei der relativen atrialen Kraftentwicklung (A) und TTP (B) zeigen sich signifikante Veränderungen bei Variation der Stimulationsfrequenz. HRT (C) und tau (D) zeigten hingegen keine signifikante frequenzabhängige Anpassungen (N=4 Patient:innen; n=6 Muskelstreifen, one-way ANOVA RM).

TTP: time to peak, HRT: half relaxation time, tau: Relaxationskonstante

3.1.2 ISO-Konzentrationskurve

Neben der frequenzabhängigen Anpassung der Kontraktilität der atrialen Muskelstreifen wurde im Rahmen der Vorversuche auch die Dosis-Wirkungs-Beziehung von ISO auf atriale in-vitro Funktionsparameter untersucht. Dies sollte verifizieren, dass der funktionelle, halbmaximale Effekt einer Behandlung mit ISO bei einer Konzentration von 20 nM erreicht wird, wie in der Literatur beschrieben (Negroni et al., 2015). So sollte gesichert werden, dass potenzielle Effekte einer zusätzlichen Behandlung mit BNP oder LBQ657 ± Valsartan nicht durch das Ausschöpfen der funktionellen Reserve allein durch ISO maskiert werden.

Wie erwartet führte die Behandlung mit ansteigenden ISO-Konzentrationen zu einer dosisabhängigen Zunahme der entwickelten Kontraktionskraft und einer Reduktion der TTP und der Relaxationskonstante tau (siehe Abbildung 3-3 und 3-4). Bei höheren ISO-Konzentrationen kam es zu einer zunehmenden Sättigung der relativen Kraftzunahme mit einem Plateau bei einer Konzentration von 200-300 nM ISO (siehe Abbildung 3-3). In der Detailanalyse in Abbildung 3-4 ist zudem deutlich sichtbar, dass tatsächlich bei einer Konzentration von 20 nM ISO (markiert durch die gestrichelte Linie in Abbildung 3-4A) eine etwa halbmaximale relative Zunahme der Inotropie beobachtet werden konnte, wie sie basierend auf der verfügbaren Literatur zu erwarten war (Negroni et al., 2015).

Auch für weitere Funktionsparameter zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Effekt von ISO, welcher erst bei ISO-Konzentrationen von deutlich >20 nM ein Plateau erreichte (siehe Abbildung 3-4B und 3-4C). Aus diesem Grund wurde für die folgenden (Haupt-)Versuche eine Konzentration von 20 nM ISO gewählt, um potenzielle Effekte von BNP und LBQ657 ± Valsartan auf die funktionelle Reserve, falls vorhanden, sicher auflösen zu können.

3 Ergebnisse

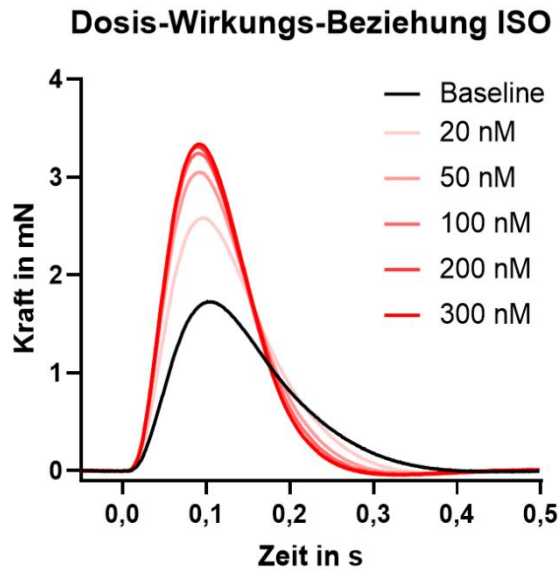


Abbildung 3-3: Veränderung der Kontraktionskurve eines atrialen Muskelstreifens nach Behandlung mit steigenden ISO-Konzentrationen

(Teilschritte 0 nM, 20 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM, 300 nM ISO, Messung vom 26.11.2018).

Bei höheren ISO-Konzentrationen (zunehmende Farbintensität der Kurve) ist eine Sättigung der Kraftzunahme zu beobachten.

ISO: Isoproterenol

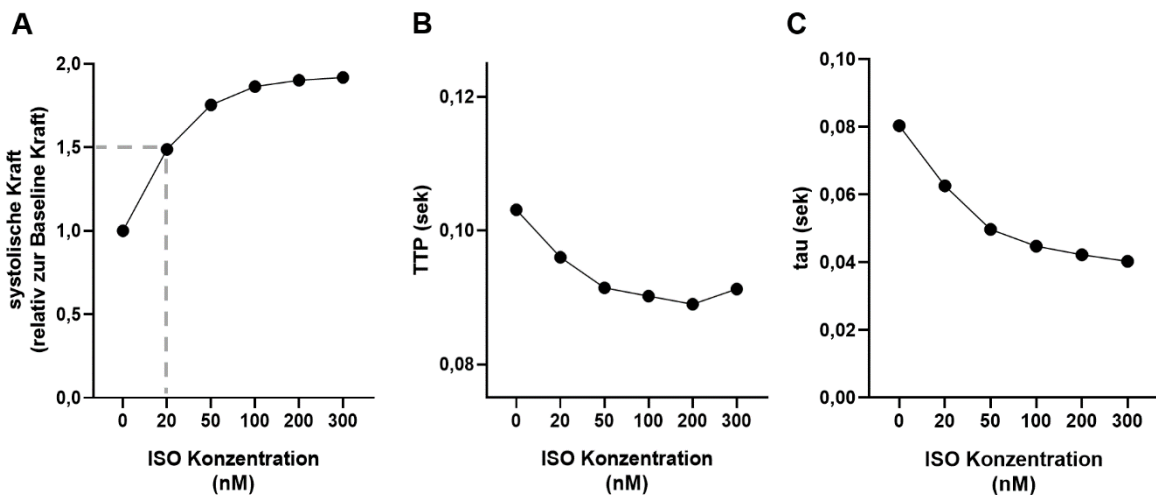


Abbildung 3-4: Veränderung funktioneller Parameter in Reaktion auf ansteigende ISO-Konzentrationen

Anpassung der systolischen Kraft (A), TTP (B) und tau (C) im Rahmen ansteigender ISO-Konzentrationen (erweiterte Darstellung des in Abbildung 3-3 gezeigten Muskelstreifens; Messung vom 26.11.2018)

ISO: Isoproterenol, TTP: time to peak, tau: Relaxationskonstante

3.2 Charakterisierung der Patient:innen

Insgesamt wurden funktionelle Messungen an Proben von 42 Patient:innen durchgeführt. Es handelte es sich um ein eher älteres (Durchschnittsalter 71 Jahre) und männliches Kollektiv (86 % männlich) mit meist multiplen kardiovaskulären Risikofaktoren. 29 % der eingeschlossenen Patient:innen litten an einer vorbeschriebenen Herzinsuffizienz; 26 % waren an Vorhofflimmern erkrankt. Die Mehrheit der Patient:innen wurde im Rahmen der Grunderkrankungen mit ACE-Hemmern/AT₁-Antagonisten, β -Blockern und einem Statin behandelt (siehe Tabelle 3-1). Bei 83 % der Patient:innen wurde eine Bypass-Operation durchgeführt, weitere 24 % der Patient:innen erhielten eine Aortenklappenersatz-Operation. Insgesamt wurden bei 24 % der Patient:innen mehrere OP-Verfahren miteinander kombiniert.

Durch echokardiographische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Patient:innen im Median eine EF von 53 % aufwiesen. Eine leichte LV-Hypertrophie war bei der Mehrheit der Patient:innen nachweisbar (medianer Septumdiameter: 13 mm, posteriorer Wanddurchmesser: 12 mm). Die LAEF war mit 50 % im Median im Kollektiv normwertig; durch die Strain-Analyse (LA strain 19 % (Median)) konnte jedoch eine leichte subklinische Einschränkung der LA Funktion nachgewiesen werden. Die rechtsatriale EF (RAEF) war mit 52 % normwertig. In Tabelle 3-1 und Tabelle 3-2 sind zudem weitere Details abgebildet.

3 Ergebnisse

Tabelle 3-1: *Patient:innencharakteristika , -vorerkrankungen und durchgeführte OP-Verfahren*

	Median (IQR) oder Anteil in %	Absoluter Anteil am Kollektiv	
<u>allg. Charakteristika</u>			
Alter	71 (66-77)		
BMI	27 (24-30)		
Geschlecht (männlich)	86 %	36/42	
arterielle Hypertonie	76 %	32/42	
Dyslipidämie	45 %	19/42	
Adipositas	26 %	11/42	
Diabetes Mellitus	33 %	14/42	
Koronare Herzerkr.	88 %	37/42	
Vorhofflimmern	26 %	11/42	
COPD	14 %	6/42	
Herzinsuffizienz	29 %	12/42	
CKD	17 %	7/42	
Nikotinabusus	33 %	14/42	
Alkoholabusus	7 %	3/42	
<u>Medikation</u>			
ACE Inhibitor/ AT1- Rezeptor-Blocker	76 %	32/42	
β-Blocker	64 %	27/42	
Diuretika	36 %	15/42	
MRI	14 %	6/42	
ARNIs	2 %	1/42	
Statin	64 %	27/42	
Orales Antidiabetikum	26 %	11/42	
Insulin	5 %	2/42	
<u>OP Verfahren</u>			
Bypass-Operation	83 %	35/42	
Aortenklappenersatz- Operation oder Rekonstruktion	24 %	10/42	<i>Die Werte werden entweder als Median (mit interquartiler Spanne) oder als Prozentwert (mit absolutem Anteil am Gesamtkollektiv) angegeben. (Beachte: in 10/42 Patient:innen wurden mehrere OP-Verfahren kombiniert)</i> <i>BMI: body mass index, COPD: chronisch obstruktive Lungenerkrankung, CKD: chronische Niereninsuffizienz, MRI: Aldosteronantagonisten, ARNI: Angiotensin-Rezeptor-Nepriylisin-Inhibitor</i>
Mitralklappenersatz- Operation oder Rekonstruktion	5 %	2/42	
Aortenwurzelersatz- Operation	12 %	5/42	

Die Werte werden entweder als Median (mit interquartiler Spanne) oder als Prozentwert (mit absolutem Anteil am Gesamtkollektiv) angegeben. (Beachte: in 10/42 Patient:innen wurden mehrere OP-Verfahren kombiniert)

BMI: body mass index, COPD: chronisch obstruktive Lungenerkrankung, CKD: chronische Niereninsuffizienz, MRI: Aldosteronantagonisten, ARNI: Angiotensin-Rezeptor-Nepriylisin-Inhibitor

(Übersetzt und angepasst aus Tabelle 1 in Primessnig & Deißler et al., 2022)

3 Ergebnisse

Tabelle 3-2: Echokardiographische Funktionsparameter und präoperative Laborparameter

	Median (IQR)	Patient:innen mit erfasstem Parameter
<u>Echokardiographie</u>		
<u>Parameter</u>		
LVEF (%)	53 (45-57)	N=42
LVEDD (mm)	46 (44-52)	N=41
IVSd (mm)	13 (12-14)	N=41
PWd (mm)	12 (11-12)	N=41
LA Volumen biplan (ml)	61 (51-81)	N=36
LAVI (ml/m ²)	31 (27-38)	N=35
LA Diameter (mm)	38 (35-40)	N=39
LA emptying fraction (Norm >37 %)	50 (35-55)	N=35
LA strain (>23 % norm)	19 (14-29)	N=20
RA Fläche (cm ²)	16 (14-20)	N=36
RA Diameter (mm)	35 (28-38)	N=38
RA emptying fraction (Norm >37 %)	52 (33-59)	N=32
RA Strain Reservoir+Conduit (ξe)	42 (31-49)	N=14
E/É	11 (10-13)	N=17
TAPSE (mm)	19 (17-23)	N=39
RVEDD (mm)	35 (31-39)	N=37
sPAP (mmHg)	25 (24-31)	N=21
<u>Laborparameter</u>		
Hb(g/dl)	14 (13-15)	N=42
Na+(mmol/l)	140 (138-143)	N=42
K+(mmol/l)	4,2 (4,0-4,5)	N=42
NT-proBNP (ng/l)	769 (396-1984)	N=23
GFR (ml/min)	76 (61-90)	N=42
Creatinin (mg/dl)	0,95 (0,79-1,17)	N=42
CRP (mg/l)	2,75 (0,9-11,23)	N=42
HbA1c mmol/mol Hb	41 (38-46)	N=19

Die Werte werden als Median (mit interquartiler Spanne, IQR) angegeben. Da insbesondere die Qualität der echokardiographischen Aufnahmen nicht immer ausreichend war, wird ebenfalls die Anzahl der Patient:innen angegeben, bei welchen eine Bestimmung der echokardiographischen/laborchemischen Parameter möglich war.

LVEF: linksventrikuläre Ejektionsfraktion, LVEDD: linksventrikulärer enddiastolischer Diameter, IVSd: diastolischer ventrikulärer Septumdiameter, PWd: diastolischer Diameter der posterioren Wand, LA: linksatrial, LAVI: linksatrialer Volumenindex, RA: rechtsatrial, TAPSE: tricuspid annular plane systolic excursion, RVEDD: rechtsventrikulärer enddiastolischer Diameter, sPAP: systolischer pulmonalarterieller Druck. (Übersetzt und angepasst aus Tabelle 1 in Primessnig & Deißler et al., 2022)

3.3 Der Effekt von BNP auf atriale Funktion und Arrhythmogenese – Protokoll 1

In einem ersten Schritt sollte die Frage beantwortet werden, inwieweit BNP die atriale Inotropie und Lusitropie bei einer konstanten, physiologischen Stimulationsfrequenz von 1 Hz unter ISO-Behandlung beeinflusst. Zudem sollte auch die potenzielle antiarrhythmische Wirkung von BNP bei konstanter Stimulationsfrequenz unter ISO-Behandlung untersucht werden. Insgesamt wurden im Rahmen des abgebildeten Protokolls Messungen an n=20 Muskelstreifen durchgeführt, welche aus Gewebeproben von N=9 Patient:innen gewonnen wurden. In Abbildung 3-5 sind Beispielmessungen der durchgeführten Versuche abgebildet.

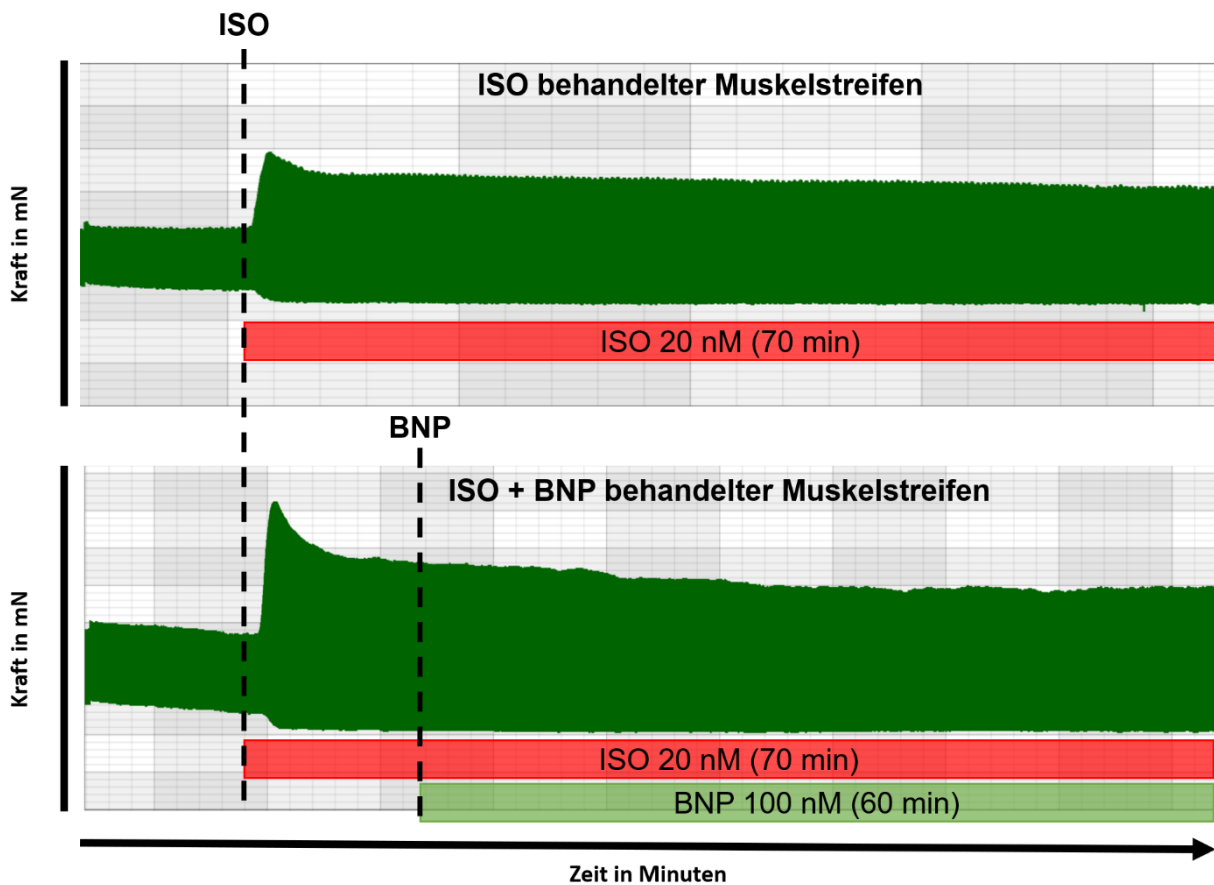


Abbildung 3-5: Beispiellabbildungen aus dem Langzeitprotokoll mit ISO ± BNP-Behandlung

Kontraktionsprofil der Kontrollgruppe (ISO behandelte Muskelstreifen, Messung vom 12.11.2019 S4V1) und der Interventionsgruppe (ISO + BNP behandelte Muskelstreifen, Messung vom 12.11.2019 S1V1).

ISO: Isoproterenol, BNP: Brain Natriuretic Peptide

3.3.1 Zeitabhängige Effekte von BNP auf die entwickelte systolische Kraft

Es konnte kein positiv-inotroper Effekt von 100 nM BNP auf die entwickelte Kraft unter ISO-Behandlung 10 Minuten (Daten gepoolt aus Protokoll 1 und 2) oder 60 Minuten nach BNP-Gabe erfasst werden (siehe Abbildung 3-6A und 3-6B). Mit der Messung nach 60 Minuten wurde zudem ein potenzieller krafterhaltender Effekt (im Sinne eines BNP-vermittelt verminderten Kraftabfalls über die Zeit) von BNP auf das atriale Myokard weitgehend ausgeschlossen. Interessanterweise konnte jedoch eine signifikante Korrelation zwischen dem Plasma NT-proBNP Spiegel der Patient:innen (einem Surrogatmarker für die Konzentration zirkulierender NPs) und der relativen Kraftzunahme unter ISO-Behandlung gezeigt werden (Abb. 3-6C; $r=0,65$, $p=0,0026$), was auf einen potenziellen positiven Effekt von BNP auf die funktionelle inotrope Reserve bei chronischer BNP-Einwirkung hinweisen könnte.

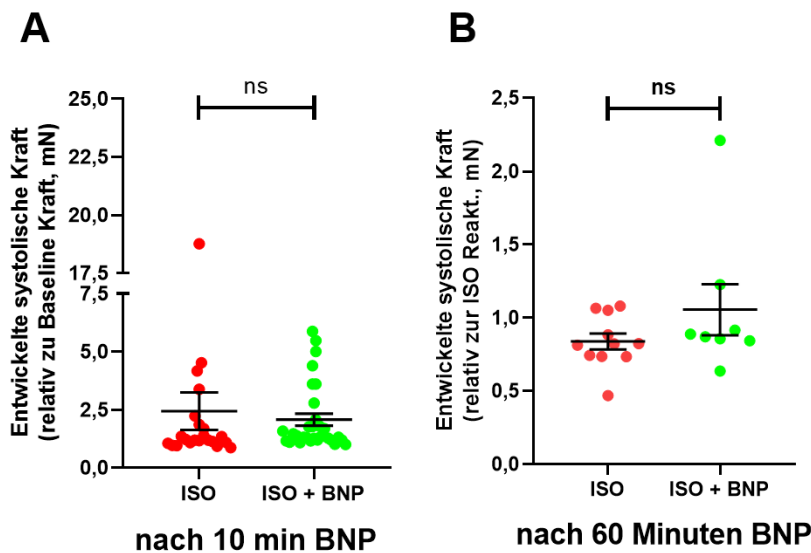
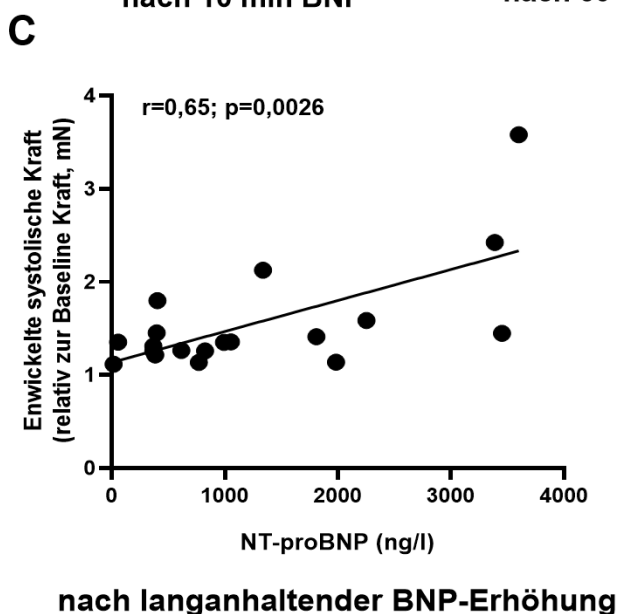


Abbildung 3-6: Relative Kraftzunahme unter ISO ± BNP-Behandlung

(A) Relative Kraftzunahme 10 Minuten nach BNP-Zugabe.

(B) Relative Kraftveränderung der Muskeln 60 Minuten nach BNP-Zugabe (relativ zur entwickelten Kraft 10 min nach ISO-Gabe).

(C) Korrelation des Plasma NT-proBNP der Patient:innen (N=19) mit der relativen entwickelten Kraft 10 min nach ISO-Gabe.



(A) und (C) enthalten gepoolte Daten aus Protokoll 1 und 2. (C) enthält zudem Daten von zwei Muskelstreifen von zwei Patient:innen, welche lediglich für 10 min mit ISO behandelt wurden.

ISO: Isoproterenol, BNP: Brain Natriuretic Peptide

(Übersetzt und angepasst aus Abbildung 1 in Primessnig & Deißler et al., 2022)

3 Ergebnisse

Auch in der gepaarten Analyse weiterer Parameter der atrialen Inotropie und Lusitropie wie der TTP, HRT und tau konnten keine signifikanten Unterschiede vor und nach Zugabe von BNP unter ISO nachgewiesen werden (gepoolte Daten aus Protokoll 1 und 2). Nach Zugabe von BNP zeigte sich lediglich ein statistischer Trend hin zu einer Verlängerung der TTP durch BNP von $105,6 \pm 20$ ms auf $106,3 \pm 20$ ms ($p=0,067$), welcher jedoch nicht als funktionell relevant zu erachten ist (siehe Abb. 3-7).

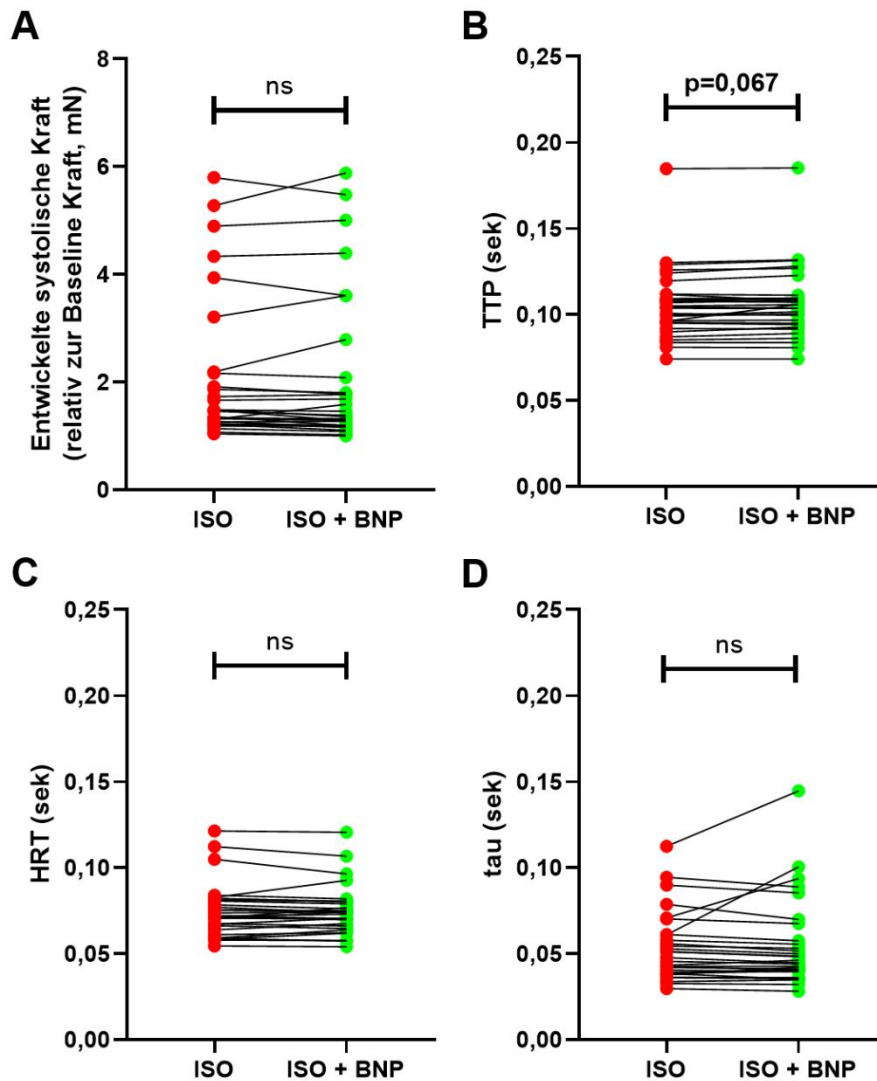


Abbildung 3-7: Änderung atrialer in-vitro Kontraktionsparameter unter ISO vor und 10 min nach Behandlung mit 100 nM BNP

In der gepaarten Analyse von $n=30$ Muskelstreifen vor und 10 Minuten nach Zugabe von 100 nM BNP wird deutlich, dass BNP keine relevanten, kurzfristigen Effekte auf die atriale in-vitro Kontraktion und Relaxation unter ISO entfaltet. (A) zeigt die Änderung der relativen entwickelten Kraft (normalisiert zur Kraft während der Baseline), (B) die time to peak. (C) bildet die half relaxation time ab und (D) die Relaxationskonstante tau. Keiner der gezeigten Parameter änderte sich nach Zugabe von BNP signifikant, lediglich für die time to peak zeichnete sich ein statistischer Trend ab ($p=0,067$, gepaarter t-Test). Die Stimulationsfrequenz betrug 1 Hz.

ISO: Isoproterenol, BNP: Brain Natriuretic Peptide, TTP: time to peak, HRT: half relaxation time, tau: Relaxationskonstante

3.3.2 Zeitabhängige Effekte von BNP auf die diastolische Spannung

Interessanterweise zeigte sich bei der Analyse der diastolischen Spannung (als weiterer lusitroper Parameter) ein deutlicher Effekt der Behandlung mit BNP. Während es in der Kontrollgruppe mit alleiniger ISO-Behandlung zu einem Anstieg der diastolischen Spannung kam, wies die zusätzlich mit 100 nM BNP behandelte Interventionsgruppe im Verlauf der Messung im Vergleich eine signifikant geringere diastolische Spannung auf ($p=0,005$; Abbildung 3-8A). Die Effekte der zusätzlichen Behandlung mit BNP auf die diastolische Spannung wurden im vorliegenden Messprotokoll 20 min nach Zugabe von BNP sichtbar. Die Veränderung der diastolischen Spannung der einzelnen Streifen unter ISO bzw. ISO + BNP über die Zeit wurde nachfolgend durch eine lineare Funktion angenähert und untersucht. Es fand sich ein Trend zu einem stärkeren Abfall der Funktion der diastolischen Spannung über die Zeit in der zusätzlich mit BNP behandelten Gruppe ($p=0,055$, Abb. 3-8B).

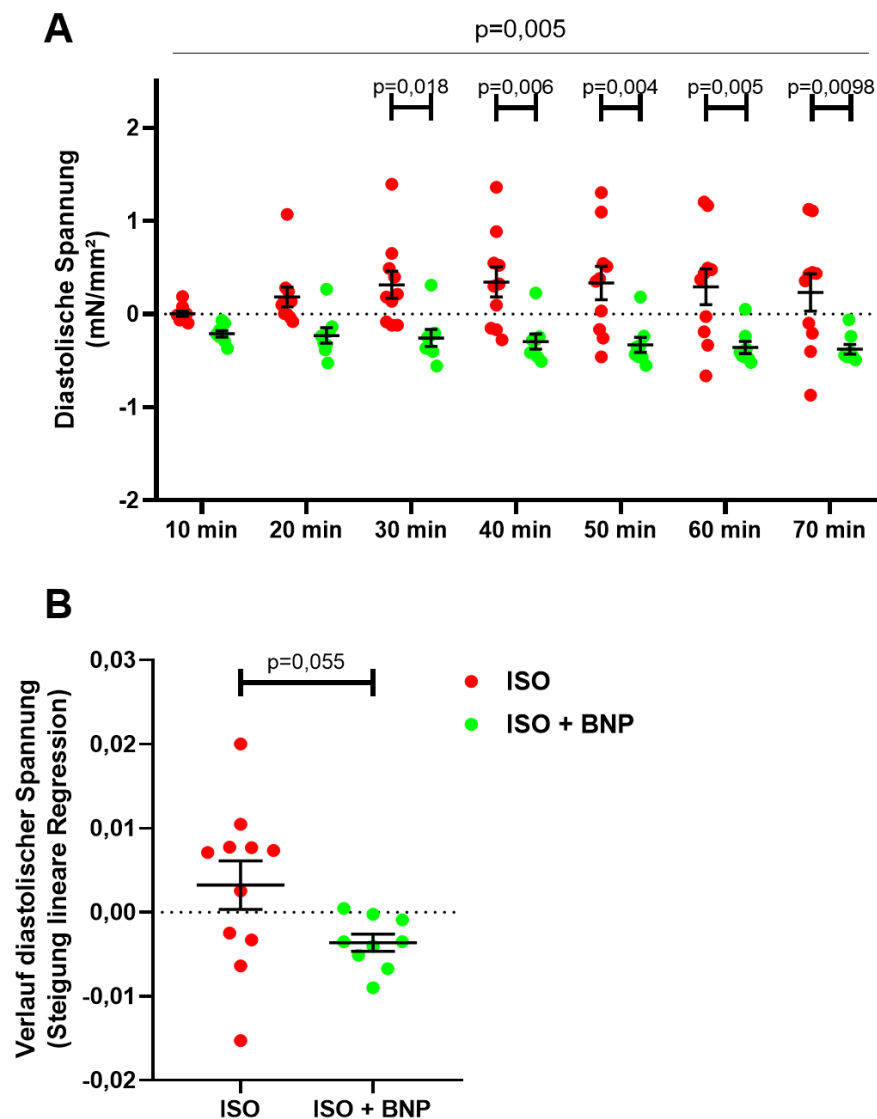


Abbildung 3-8: Änderung der diastolischen Spannung unter ISO ± BNP-Behandlung

(A) Verlauf der diastolischen Spannung in der mit ISO (rot) und ISO + BNP (grün) behandelten Gruppe; im Vergleich wurde die diastolische Spannung durch die Zugabe von BNP signifikant vermindert ($p=0,005$, two-way ANOVA RM). Zur besseren Übersicht ist die diastolische Spannung der Baseline jeweils mit 0 mN gleichgesetzt.

(B) Verlauf der diastolischen Spannung als Ergebnis einer linearen Regression ($p=0,055$, t-Test).

ISO: Isoproterenol, BNP: Brain Natriuretic Peptide

(Übersetzt und angepasst aus Abbildung 1 in Primessnig & Deißler et al., 2022)

3 Ergebnisse

3.3.3 Zeitabhängige Effekte von BNP auf die Entstehung von Arrhythmien

In einem letzten Schritt wurde das Auftreten von Arrhythmien zu drei verschiedenen Zeitpunkten (25 bis 30 min, 45 bis 50 min und 65 bis 70 min nach ISO-Gabe) quantifiziert. Der Unterschied zwischen der ISO und der ISO + BNP behandelten Gruppe ist anhand von Beispiel-Messungen in Abbildung 3-9 exemplarisch dargestellt.

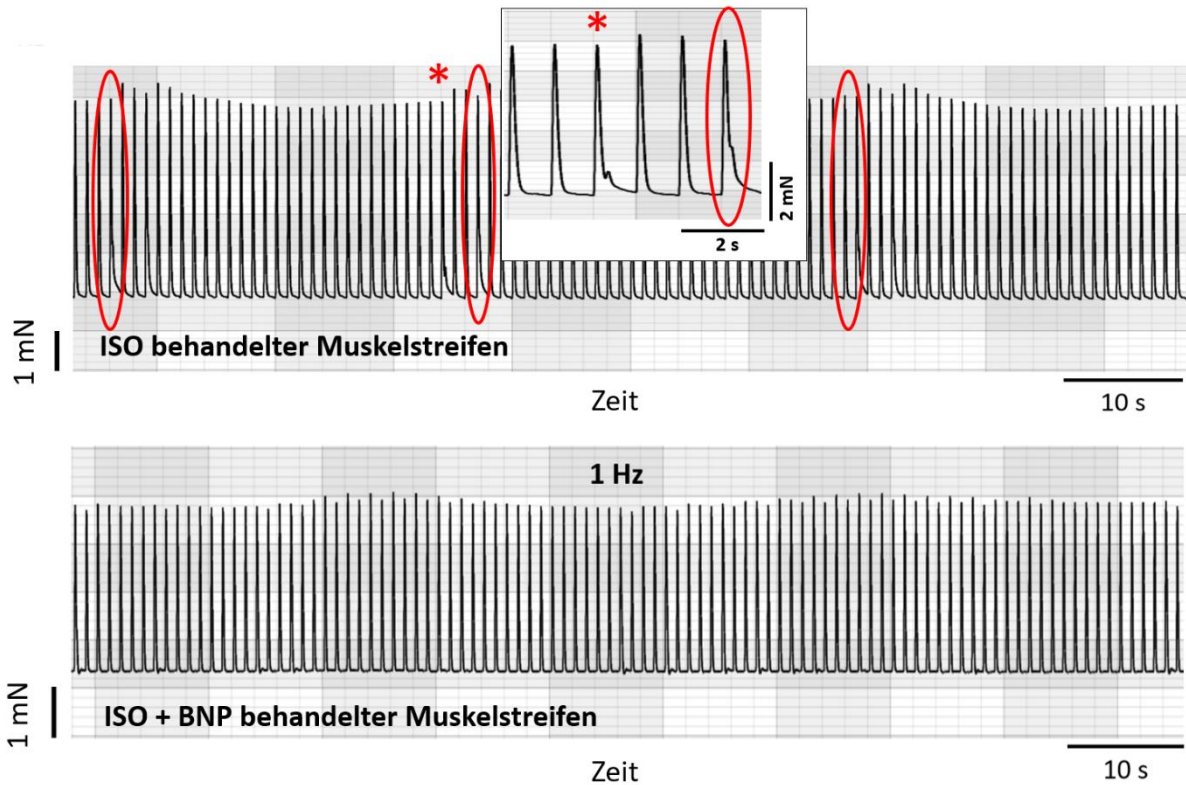


Abbildung 3-9: Beispielabbildungen von Arrhythmien im Rahmen des ISO ± BNP-Langzeitprotokolls

Muskelstreifen aus der Kontrollgruppe (ISO-Behandlung) und der Interventionsgruppe (ISO + BNP-Behandlung). Einzelne arrhythmische Schläge der Kontrollgruppe sind exemplarisch hervorgehoben (rote Umrandung); der mit einem (*) hervorgehobene Schlag ist zudem zur besseren Übersicht vergrößert abgebildet. In dem zusätzlich mit BNP behandelten Muskelstreifen sind keine Arrhythmien nachweisbar.

ISO: Isoproterenol, BNP: Brain Natriuretic Peptide

(Übersetzt und angepasst aus Abbildung 3 in Primessnig & Deißler et al., 2022)

Für jede der drei untersuchten Zeitspannen zeigte sich eine numerisch verminderte Inzidenz von Arrhythmien in der Interventionsgruppe (siehe 3-10A bis 3-10C). Eine gepoolte Analyse der Arrhythmien bestätigte einen Trend zu einer verminderten Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Arrhythmien in der zusätzlich mit BNP behandelten Gruppe: Während sich in der nur mit ISO behandelten Gruppe in 51,5 % der Zeitpunkte Arrhythmien zeigten, waren Arrhythmien nur in 29,6 % der Zeitpunkte in der mit ISO und BNP behandelten Gruppe nachweisbar ($p=0,087$). Dies entspricht

3 Ergebnisse

einer Odds Ratio von 0,40 für die zusätzlich mit BNP behandelte Gruppe (Abbildung 3-10D).

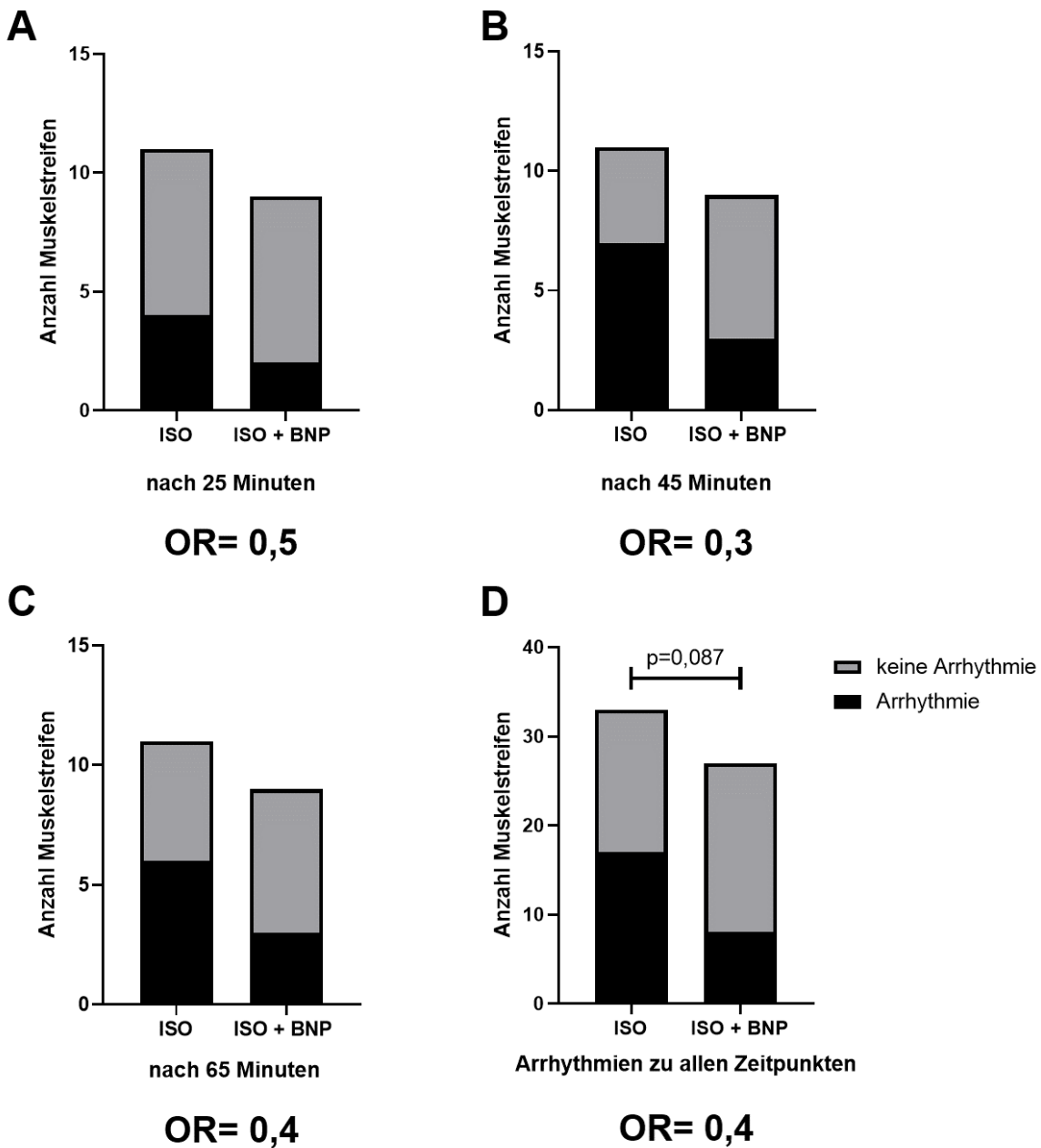


Abbildung 3-10: Anzahl arrhythmischer Muskelstreifen pro untersuchter Zeitspanne im Langzeitprotokoll unter ISO ± BNP-Behandlung

Nachweis einer Arrhythmie im Zeitraum 25 bis 30 Minuten (A), 45 bis 50 Minuten (B) und 65 bis 70 Minuten (C) nach ISO-Gabe in einem Betrachtungszeitraum von jeweils 5 Minuten. In (D) ist die Gesamtauswertung über alle untersuchten Zeitpunkte abgebildet. Für diese gepoolte Analyse zeigt sich ein statistischer Trend hin zu einer Verminderung des Arrhythmie-Risikos in der zusätzlich mit BNP behandelten Gruppe ($p=0,087$, Chi-Quadrat-Test).

ISO: Isoproterenol, BNP: Brain Natriuretic Peptide, OR: Odds Ratio

(3-10D übersetzt und angepasst aus Abbildung 3 in Primessnig & Deißler et al., 2022)

3.4 Der Effekt von BNP auf atriale Funktion und Arrhythmogenese – Protokoll 2

In einem zweiten Protokoll wurde der Effekt von BNP auf die frequenzabhängige Veränderung der Kontraktilität unter ISO untersucht (siehe Abb. 3-11). Nach Zugabe von ISO \pm BNP wurde in diesem Protokoll die Stimulationsfrequenz für je 5 Minuten auf 2 Hz, 3 Hz und 0,5 Hz verändert. So konnte neben dem Einfluss von BNP auf die frequenzabhängige Inotropie und Lusitropie und die diastolische Spannung auch das frequenzabhängige Auftreten von Arrhythmien untersucht werden. Insgesamt wurden im Rahmen des zweiten Protokolls Messungen an n=40 Muskelstreifen von N=17 Patient:innen durchgeführt.

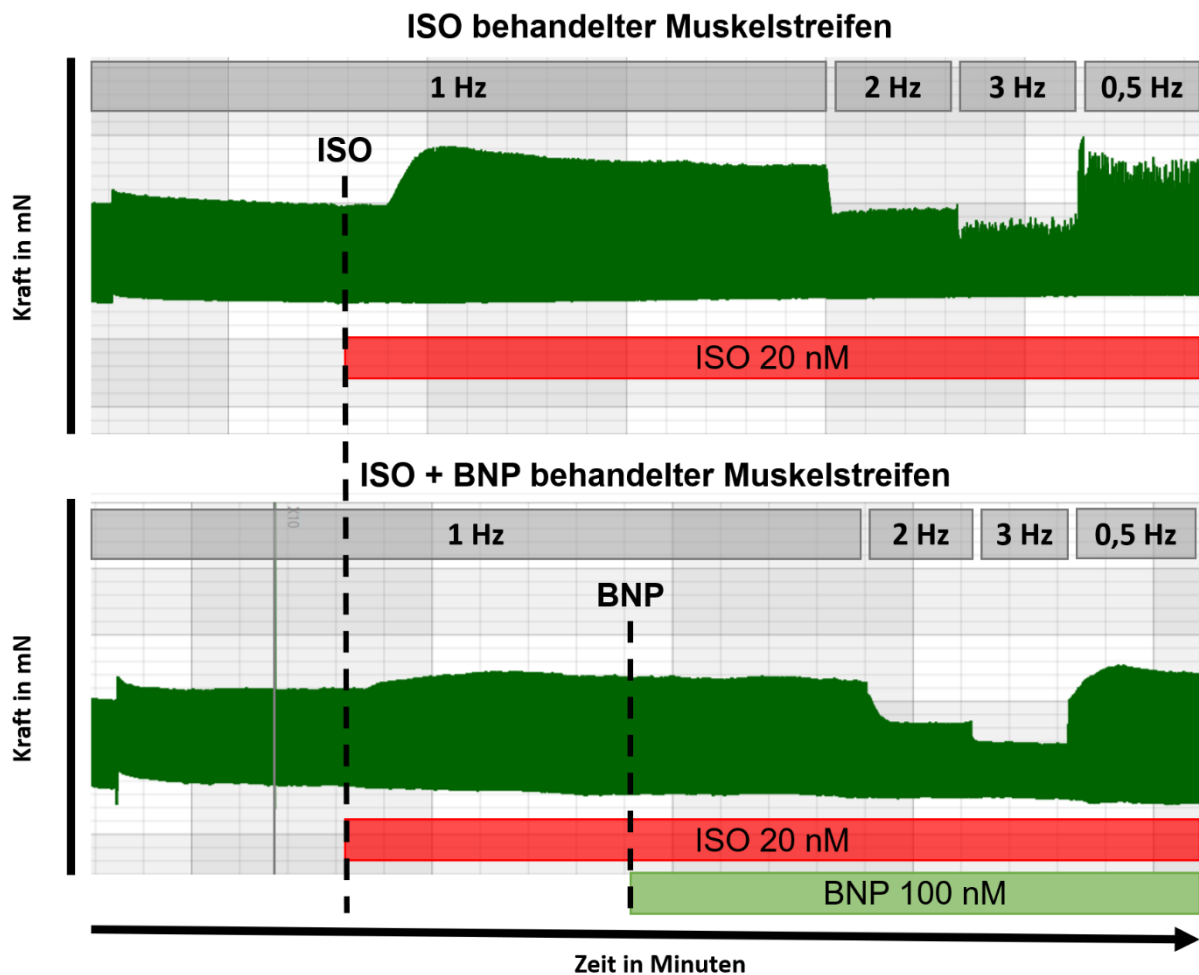


Abbildung 3-11: Beispielabbildungen aus dem Frequenzprotokoll mit ISO \pm BNP-Behandlung

Kontraktionsprofil der Kontrollgruppe (ISO behandelte Muskelstreifen, Messung vom 24.01.2019 S3V1) und der Interventionsgruppe (ISO + BNP behandelte Muskelstreifen, Messung vom 02.07.2019 S1V1).

ISO: Isoproterenol, BNP: Brain Natriuretic Peptide

3.4.1 Frequenzabhängige Effekte von BNP auf die entwickelte systolische Kraft

Wie erwartet konnte eine frequenzabhängige Veränderung der funktionellen Parameter gezeigt werden, was exemplarisch in Abbildung 3-12 an der Variation der entwickelten systolischen Kraft ($p < 0,0001$, two-way ANOVA RM) abgelesen werden kann. Eine Erhöhung der Stimulationsfrequenz ging mit einer verminderten Kraftentwicklung einher, eine Verminderung der Stimulationsfrequenz mit einer erhöhten Kraftentwicklung. Auch für die TTP ($p = 0,04$, two-way ANOVA RM) und die Relaxationskonstante τ ($p = 0,007$, two-way ANOVA RM) konnte diese Frequenzabhängigkeit während der Behandlung mit ISO \pm BNP nachgewiesen werden. Nachdem bereits im vorherigen Kapitel (3.3.1 siehe Abb. 3-6A/B, Abb. 3-7A) keine Effekte einer Behandlung mit BNP auf die atriale Inotropie und Lusitropie unter ISO bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz gezeigt werden konnten, zeigte sich im Protokoll 2 (siehe Abbildung 3-12), dass auch bei einer Variation der Stimulationsfrequenz auf 2 Hz, 3 Hz und 0,5 Hz keine BNP-Effekte auf Inotropie und Lusitropie unter ISO nachweisbar waren. Weder die Inotropie im Allgemeinen (Abb. 3-12), noch weitere Funktionsparameter wie HTTP, TTP, HRT oder τ wurden durch eine zusätzliche BNP-Behandlung signifikant beeinflusst (nicht abgebildet, alle ns).

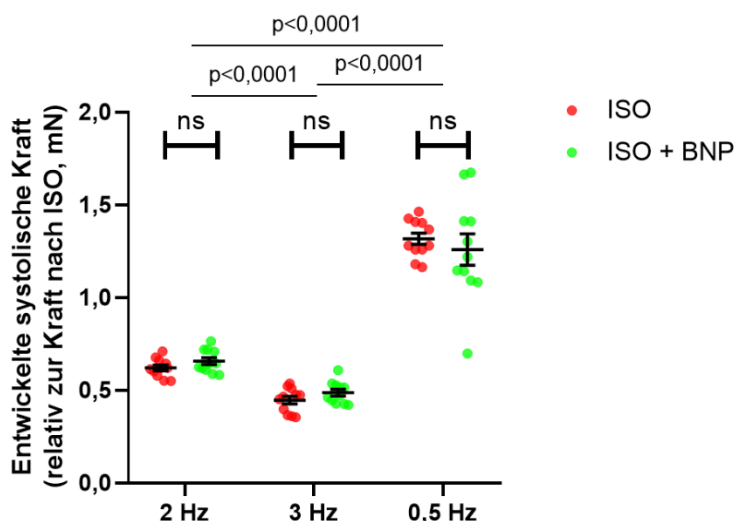


Abbildung 3-12: Veränderung der entwickelten systolischen Kraft bei Variation der Stimulationsfrequenzen nach Behandlung mit ISO \pm BNP

Eine Variation der Stimulationsfrequenz führte in beiden Gruppen (ISO und ISO + BNP) zu einer signifikanten, frequenzabhängigen Veränderung der Inotropie (two-way ANOVA RM; $p < 0,0001$). Ein Unterschied zwischen der Kontrollgruppe (ISO) und Interventionsgruppe (ISO + BNP) ließ sich nicht nachweisen. Zur besseren Darstellung wurden die Werte auf die systolische Kraft des jeweiligen Muskels bei 1 Hz Stimulationsfrequenz 10 min nach der ISO-Gabe normalisiert.

ISO: Isoproterenol, BNP: Brain Natriuretic Peptide

(Übersetzt und angepasst aus Abbildung 1 in Primessnig & Deißler et al., 2022)

3.4.2 Frequenzabhängige Effekte von BNP auf die diastolische Spannung

Die Analyse des Verlaufs der diastolischen Spannung je Gruppe (ISO vs. ISO + BNP) zeigte, dass die diastolische Spannung als lusitroper Parameter in der nur mit ISO behandelten Gruppe im Verlauf der Frequenzvariation anstieg ($p=0,049$, one-way ANOVA RM), während sie in der zusätzlich mit BNP behandelten Gruppe im Verlauf des Protokolls konstant blieb ($p=0,54$, one-way ANOVA RM). Im direkten Vergleich beider Gruppen zeigte sich eine signifikante Verminderung der diastolischen Spannung in der zusätzlich mit BNP behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrolle ($p=0,01$, two-way ANOVA RM, siehe Abbildung 3-13). Besonders deutlich war der Unterschied zwischen der Kontroll- und Interventionsgruppe in der letzten Phase des Protokolls bei einer Stimulationsfrequenz von 3 Hz und 0,5 Hz ($p=0,04$ und $p=0,002$, two-way ANOVA RM).

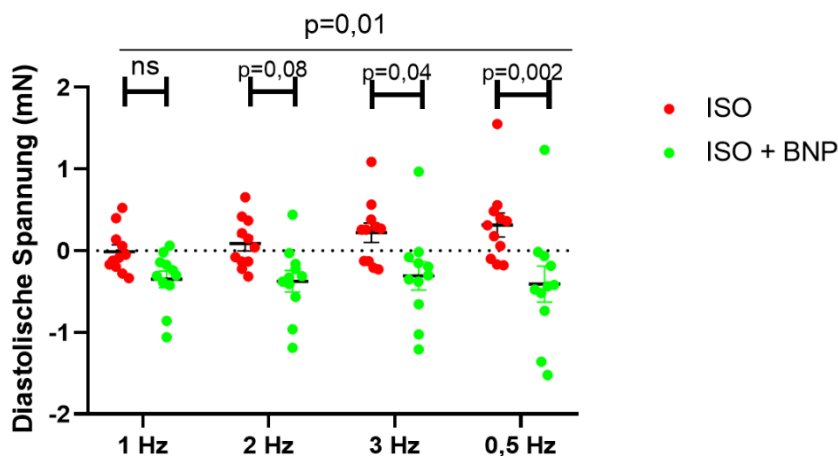


Abbildung 3-13: Änderung der diastolischen Spannung unter ISO ± BNP-Behandlung und Frequenzvariation

Im Verlauf der Messung kam es zu einem signifikanten Anstieg der diastolischen Spannung in der mit ISO behandelten Kontrollgruppe im Vergleich zur zusätzlich mit BNP behandelten Gruppe (insgesamt $p=0,01$, two-way ANOVA RM). Der Unterschied zwischen beiden Gruppen wurde insbesondere bei 3 Hz ($p=0,04$, two-way ANOVA RM) und 0,5 Hz ($p=0,002$, two-way ANOVA RM) Stimulationsfrequenz deutlich.

Zur besseren Übersicht wurde die diastolische Spannung der Baseline auf 0 mN angeglichen. Da aufgrund technischer Probleme nicht für alle Muskelstreifen ein Durchmesser erfasst werden konnte, wurden die Messwerte in dieser Abbildung nicht zusätzlich auf den Durchmesser der Muskelstreifen normiert.

ISO: Isoproterenol, BNP: Brain Natriuretic Peptide

(Übersetzt und angepasst aus Supplement Abbildung 1 in Primessnig & Deißler et al., 2022)

3.4.3 Frequenzabhängige Effekte von BNP auf die Entstehung von Arrhythmien

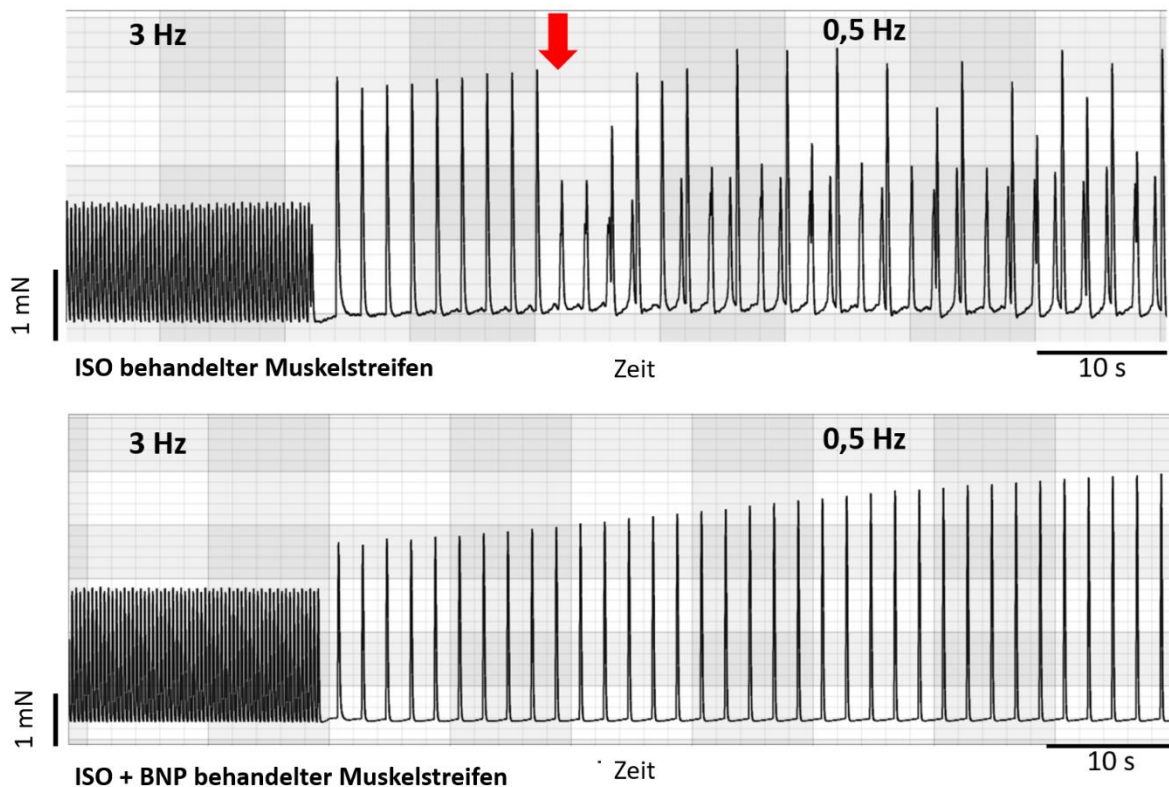


Abbildung 3-14: Beispielabbildungen von Arrhythmien im Rahmen des ISO \pm BNP-Frequenzprotokolls

Beispielaufnahmen aus der Kontroll- und Interventionsgruppe während des Übergangs zwischen 3 Hz und 0,5 Hz Stimulationsfrequenz in der letzten Phase des Messprotokolls. In der oben abgebildeten Kontraktionskurve eines Muskelstreifens mit ISO-Behandlung zeigt sich 9 Schläge nach Umstellung auf 0,5 Hz Stimulationsfrequenz die Entwicklung einer anhaltenden Arrhythmie (Beginn wird durch den roten Pfeil im Bild markiert). Im Vergleich zeigt die Abbildung eines Muskelstreifens mit ISO + BNP-Behandlung unten im Bild das Ausbleiben einer Arrhythmie.

ISO: Isoproterenol, BNP: Brain Natriuretic Peptide

(Übersetzt und angepasst aus Abbildung 3 in Primessnig & Deißler et al., 2022)

Wie bereits in dem ersten Protokoll mit konstanter Stimulationsfrequenz zeigte sich auch bei variierenden Stimulationsfrequenzen (siehe Abbildung 3-14 und 3-15) zu jedem der untersuchten Zeitpunkte des Frequenzprotokolls eine numerisch geringe Inzidenz von Arrhythmien in der zusätzlich mit BNP behandelten Gruppe (siehe Abbildung 3-15). Insbesondere nach dem Wechsel von 3 Hz auf 0,5 Hz Stimulationsfrequenz („Erholungsphase“) zeigte sich eine signifikante Verminderung des Auftretens von Arrhythmien: Während in der mit ISO behandelten Gruppe 61 % der Muskelstreifen eine Arrhythmie entwickelten, geschah dies nur in 25 % der zusätzlich mit BNP behandelten Muskelstreifen ($p=0,02$; OR= 0,21; Abb. 3-15C). Außerdem zeigte sich in der gepoolten Analyse (aller Zeitpunkte) eine signifikante

3 Ergebnisse

Verminderung der Arrhythmien in der zusätzlich mit BNP behandelten Gruppe um mehr als 50 %: Insgesamt entwickelten sich in der mit ISO behandelten Gruppe in 36 % der Fälle Arrhythmien, während dies nur in 17,3 % der Fälle in der zusätzlich mit BNP behandelten Gruppe der Fall war ($p=0,008$; OR= 0,37; siehe auch Abbildung 3-15D).

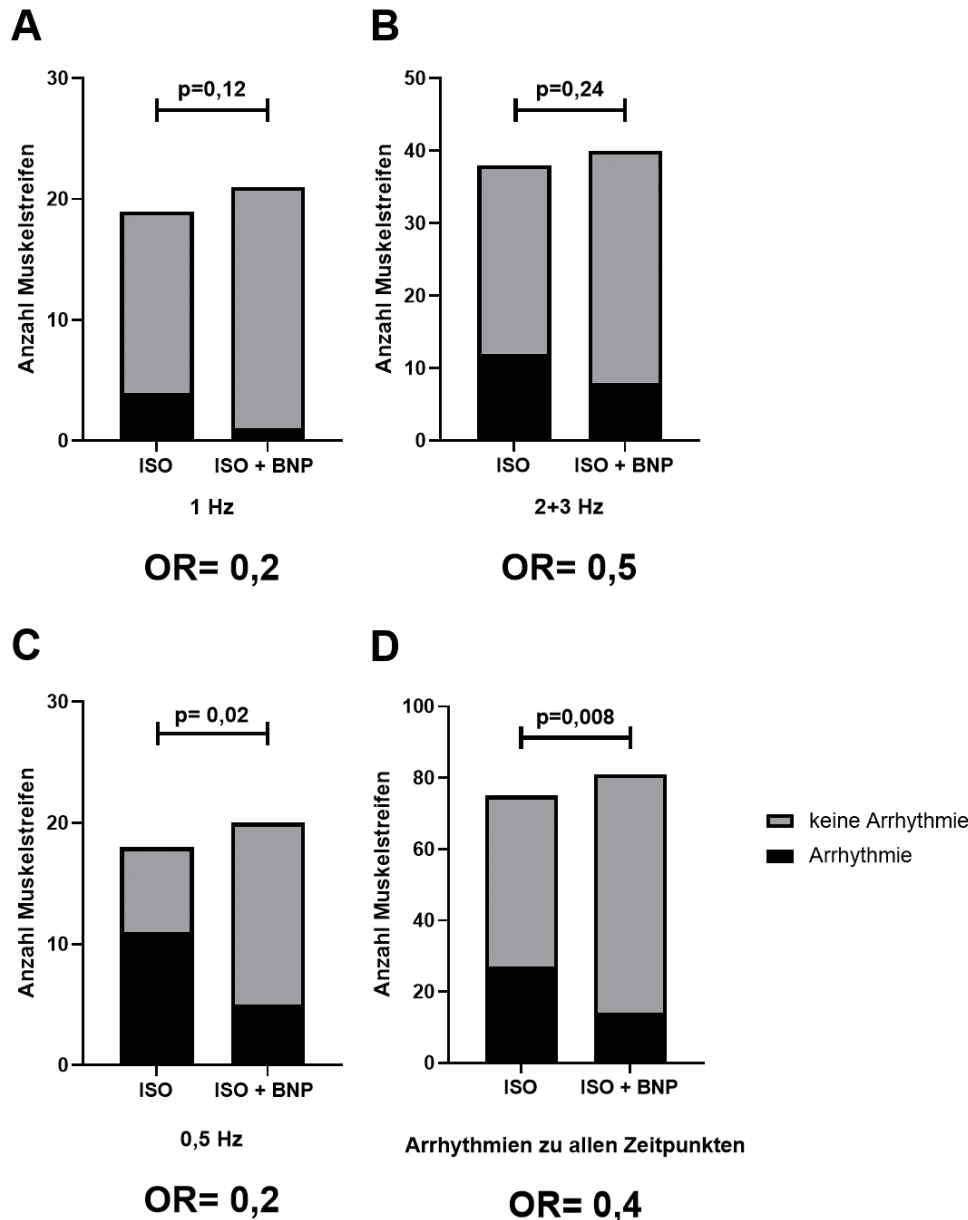


Abbildung 3-15: Anzahl arrhythmischer Muskelstreifen pro untersuchtem Zeitpunkt im ISO \pm BNP-Frequenzprotokoll

Anzahl arrhythmischer Muskelstreifen pro untersuchten Stimulationsfrequenzen: (A) bei einer Frequenz von 1 Hz und (B) bei gesteigerten Stimulationsfrequenzen (2 Hz und 3 Hz) zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen; bei 0,5 Hz (C) und in der gepoolten Analyse (alle Frequenzen, D) zeigt sich eine signifikante Verminderung des Auftretens von Arrhythmien in der zusätzlich mit BNP behandelten Gruppe (0,5 Hz $p=0,02$, gepoolt: $p=0,008$; Chi-Quadrat-Test).

ISO: Isoproterenol, BNP: Brain Natriuretic Peptide, OR: Odds Ratio

(3-15C und D übersetzt und angepasst aus Abbildung 3 in Primessnig & Deißler et al., 2022)

3.5 Der Effekt von Sacubitrilat (LBQ657) auf atriale Funktion und Arrhythmogenese – Protokoll 3

Die Ergebnisse der ersten beiden Versuchsreihen legten nahe, dass BNP vorteilhafte Effekte auf die diastolische Spannung und auf die Entstehung von Arrhythmien entfaltet. Die verwendete Konzentration von 100 nM BNP lag jedoch über den im menschlichen Körper vorkommenden BNP-Konzentrationen (bei terminaler Herzinsuffizienz werden durchschnittliche Plasma BNP-Konzentrationen von 0,074 nM in-vivo beschrieben (Goetze et al., 2020)). Inwieweit eine pharmakologische Erhöhung der intrinsisch in humanem atrialem Myokard vorliegenden NPs die systolische Kraftentwicklung bzw. inotrope Reserve, diastolische Spannung und Arrhythmogenese unter ISO beeinflusst, sollte deshalb in einem nächsten Schritt durch die Behandlung die Muskelstreifen mit Sacubitrilat (LBQ657), dem aktiven Wirkstoff des ARNIs Entresto® (LBQ657/Valsartan), untersucht werden.

Da eine Behandlung mit LBQ657 neben dem Abbau der NPs ANP und BNP jedoch auch den Abbau weitere Hormone (wie etwa AT₂, Bradykinin oder ET-1) mit teilweise gegenteiliger Wirkung am Myokard beeinflusst, sollten in diesem Messprotokoll im Wesentlichen zwei Fragen untersucht werden: Einerseits sollte geklärt werden, inwieweit die Effekte der natürlich im Myokard vorliegenden NPs durch eine Behandlung mit LBQ657 moduliert/verstärkt werden können. Zudem sollte auch eine potenzielle Überlagerung der positiven NP-Effekte durch die partiell gegensätzliche Wirkung von insbesondere AT₂ und ET-1 untersucht werden.

Wie bereits im vorhergehenden Messprotokoll wurde für diesen Zweck ein Protokoll mit ISO-Stimulation und anschließender Variation der Stimulationsfrequenz gewählt (siehe Abbildung 3-16). Um eine ausreichende Inhibition der NEP durch LBQ657 zu gewährleisten, wurden die Muskeln nach der Präparation für 60 Minuten entweder mit dem Vehikel (DMSO) oder mit LBQ657 präinkubiert. In der Perfusionslösung der Muskelstreifen befand sich zur Aufrechterhaltung der Wirkung während der gesamten Messung ebenfalls entweder das Vehikel oder LBQ657. Die LBQ-Konzentration während Präinkubation und Messung entsprach jeweils der maximalen in-vivo Plasmakonzentration bei oraler Behandlung mit Sac/Val (Entresto®). Insgesamt wurden n=15 Muskelstreifen von N=5 Patient:innen untersucht.

3 Ergebnisse

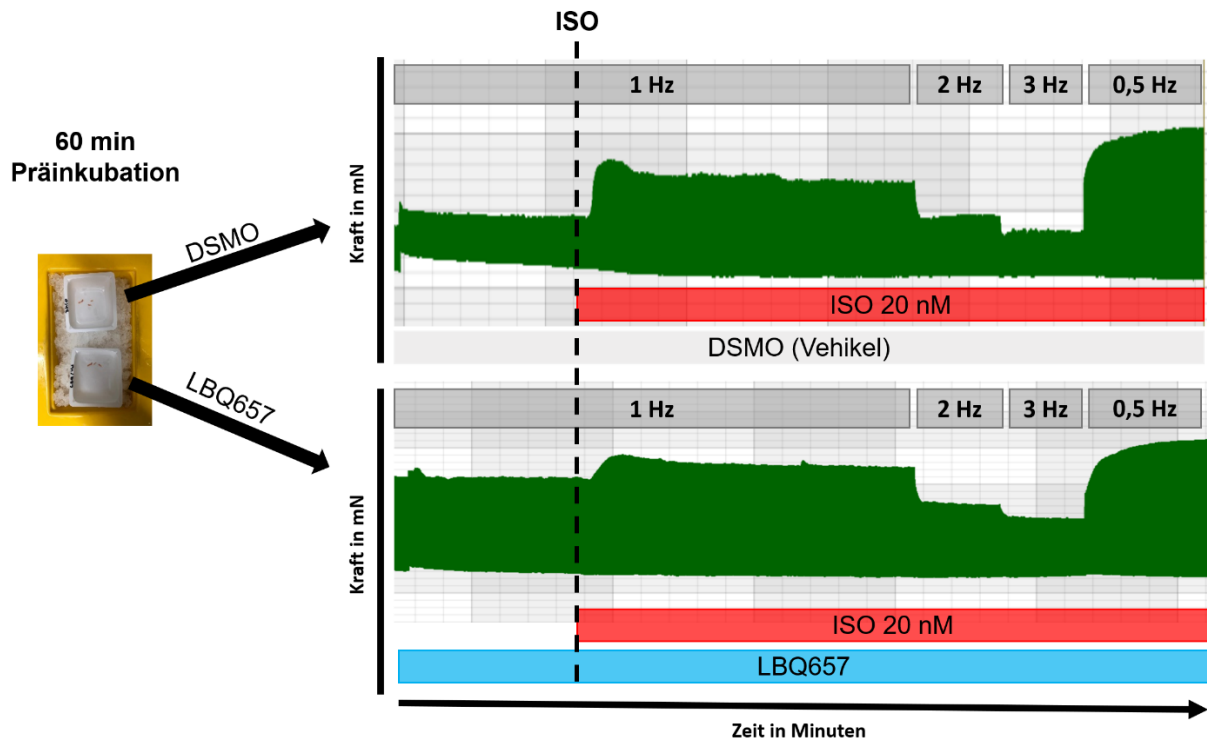


Abbildung 3-16: Beispielabbildungen aus dem Frequenzprotokoll mit Vehikel (DMSO)- oder LBQ657-Behandlung

Kontraktionsprofile der Kontrollgruppe (DMSO + ISO behandelte Muskelstreifen, oben) und der Interventionsgruppe (LBQ657 + ISO behandelte Muskelstreifen, unten). Messungen vom 17.12.2019 (P1S4V2 und P2S1V1).

ISO: Isoproterenol, LBQ657: Sacubitrilat, DMSO: Dimethylsulfoxid (Lösungsmittel)

3.5.1 Frequenzabhängige Effekte von LBQ657 auf die entwickelte systolische Kraft

Wie in Abbildung 3-17B zu sehen ist, kam es auch in den mit LBQ657 bzw. DMSO präinkubierten Muskelstreifen unter ISO-Behandlung zu einer frequenzabhängigen Veränderung der Kontraktilität ($p < 0,0001$). Die zusätzliche Präinkubation und Präsenz von LBQ657 hatte im Vergleich zur Kontrollgruppe keinen Einfluss auf die Kraftentwicklung, weder bei der basalen Stimulationsfrequenz von 1 Hz (Abb. 317A), noch bei variierenden Frequenzen (2 Hz, 3 Hz oder 0,5 Hz). Auch die übrigen untersuchten Parameter der Kontraktion wie etwa HTTP, TTP, HRT und tau wurden durch die Behandlung mit LBQ657 nicht signifikant beeinflusst (Daten nicht abgebildet; two-way ANOVA RM ns für alle Parameter).

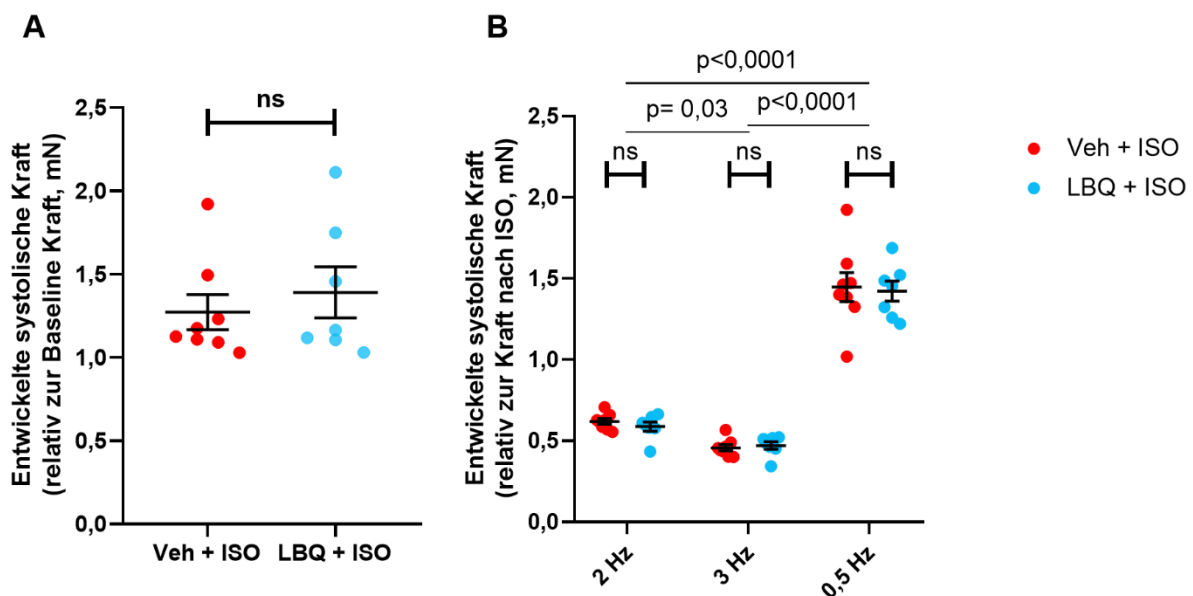


Abbildung 3-17: Allgemeine und frequenzabhängige Veränderung der entwickelten systolischen Kraft in mit Vehikel (DMSO) oder LBQ657 behandelten Muskelstreifen unter ISO-Behandlung

(A) Relative entwickelte systolische Kraft 10 min nach ISO-Gabe bei 1 Hz Stimulationsfrequenz. Zur besseren Übersicht wurden die Werte auf die Baseline-Kraft des jeweiligen Muskelstreifens normalisiert. (B) Entwickelte Kraft bei variierenden Stimulationsfrequenzen. Zur besseren Darstellung wurden die Werte auf die systolische Kraft des jeweiligen Muskels 10 min nach ISO-Gabe bei 1 Hz normalisiert. Neben der frequenzabhängigen Veränderung der entwickelten Kraft ($p < 0,0001$ two-way ANOVA RM) zeigt sich kein Effekt einer LBQ657 Behandlung auf die entwickelte Kraft der Muskelstreifen.

ISO: Isoproterenol, LBQ657/LBQ: Sacubitrilat, Veh: Vehikel (DMSO)

(Übersetzt und angepasst aus Abbildung 2 in Primessnig & Deißler et al., 2022)

3 Ergebnisse

3.5.2 Frequenzabhängige Effekte von LBQ657 auf die diastolische Spannung

Weiterhin fanden sich unter ISO-Behandlung weder in der DMSO-Gruppe, noch in der LBQ657-Gruppe frequenzabhängige Unterschiede in der diastolischen Spannung als Parameter der Lusitropie (Abbildung 3-18). Auch im direkten Vergleich wurden zwischen Kontroll- und Interventionsgruppe keine Unterschiede in der diastolischen Spannung festgestellt.

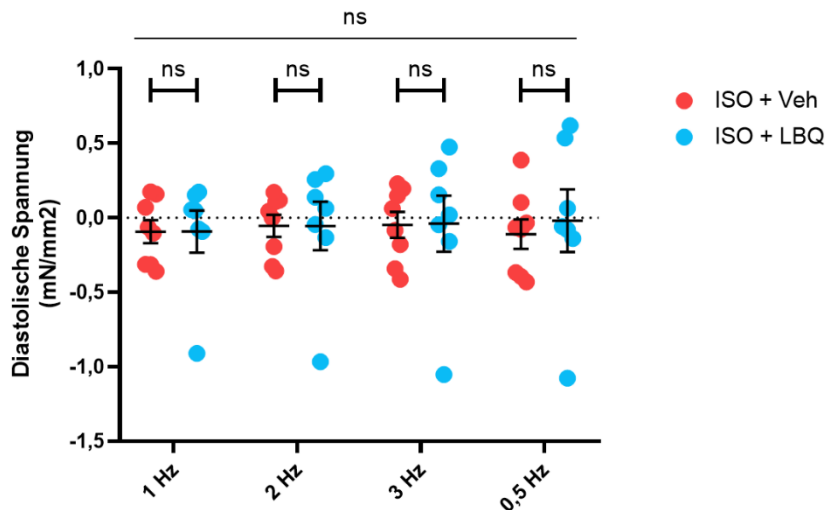


Abbildung 3-18: Änderung der diastolischen Spannung unter ISO-Behandlung und Frequenzvariation in mit Vehikel (DMSO) oder LBQ657 behandelten Muskelstreifen

Im Verlauf der Messung konnte kein signifikanter Unterschied der diastolischen Spannung zwischen der Kontroll- und Interventionsgruppe gezeigt werden ($p=0,89$, two-way ANOVA RM). Zur besseren Übersicht wurde die diastolische Spannung der Baseline auf 0 mN angeglichen.

ISO: Isoproterenol, LBQ657/LBQ: Sacubitrilat, Veh: Vehikel (DMSO)

(Übersetzt und angepasst aus Supplement Abbildung 2 in Primessnig & Deißler et al., 2022)

3.5.3 Frequenzabhängige Effekte von LBQ657 auf die Entstehung von Arrhythmien

Schließlich wurde das Auftreten von Arrhythmien wie bereits in den vorherigen Messreihen zu jeder Phase (=Frequenz) des Protokolls erhoben. Es konnte auch an dieser Stelle kein Effekt von LBQ657 auf die Arrhythmogenese in atrialen Muskelstreifen gezeigt werden (Abbildung 3-19, gepoolte Analyse). Insgesamt kam es in der mit DMSO behandelten Kontrollgruppe in 53 % der Fälle zu Arrhythmien, während in der mit LBQ657 behandelten Gruppe in 61 % der Fälle Arrhythmien nachweisbar waren ($p=0,55$, Chi-Quadrat-Test).

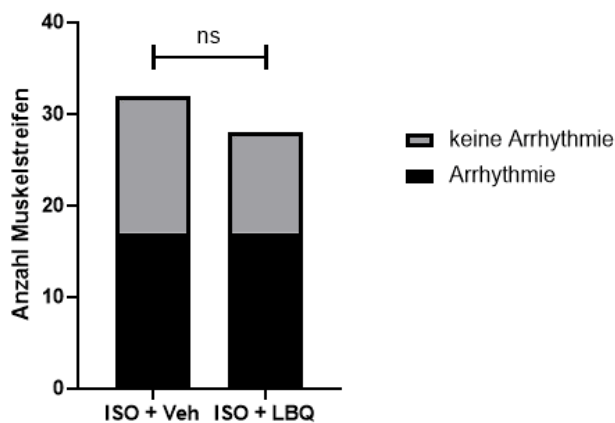


Abbildung 3-19: Gesamtauswertung der Anzahl arrhythmischer Muskelstreifen pro untersuchtem Zeitpunkt im Frequenzprotokoll mit Vehikel (DMSO)- oder LBQ657-Behandlung

Die gepoolte Analyse aller Zeitpunkte zeigte, dass die alleinige Behandlung mit LBQ657 zu keiner Verminderung des Auftretens von Arrhythmien führt ($p=0,55$, Chi-Quadrat-Test).

ISO: Isoproterenol, LBQ657/LBQ: Sacubitrilat, Veh: Vehikel (DMSO)

3.6 Der Effekt von LBQ657 und Valsartan auf atriale Funktion und Arrhythmogenese – Protokoll 4

In einem letzten Schritt wurde schließlich die Auswirkung der klinisch angewandten Wirkstoffkombination aus NEP-Inhibitor und Valsartan (den beiden aktiven Wirkstoffen von Entresto®) auf die atriale Funktion und Arrhythmogenese untersucht. In diesem Protokoll sollte dem verminderten Abbau von AT2 (bedingt durch die NEP-Inhibition) durch die zusätzliche Inhibition der AT₁-Rezeptoren durch Valsartan entgegengewirkt werden. Wie in den vorhergehenden Messprotokollen wurde ein Protokoll mit ISO-Behandlung und anschließender Variation der Stimulationsfrequenz gewählt (für Beispielmessungen siehe Abb. 3-20). Um eine ausreichende Inhibition der NEP durch LBQ657 zu gewährleisten, wurden die Muskeln nach der Präparation für 60 Minuten entweder mit dem Vehikel (DMSO) oder mit LBQ657/Valsartan präinkubiert. In der Perfusionslösung der Muskelstreifen befand sich ebenfalls während der gesamten Messung entweder das Vehikel oder LBQ657/Valsartan. Insgesamt wurden n=24 Muskelstreifen von N=9 Patient:innen untersucht.

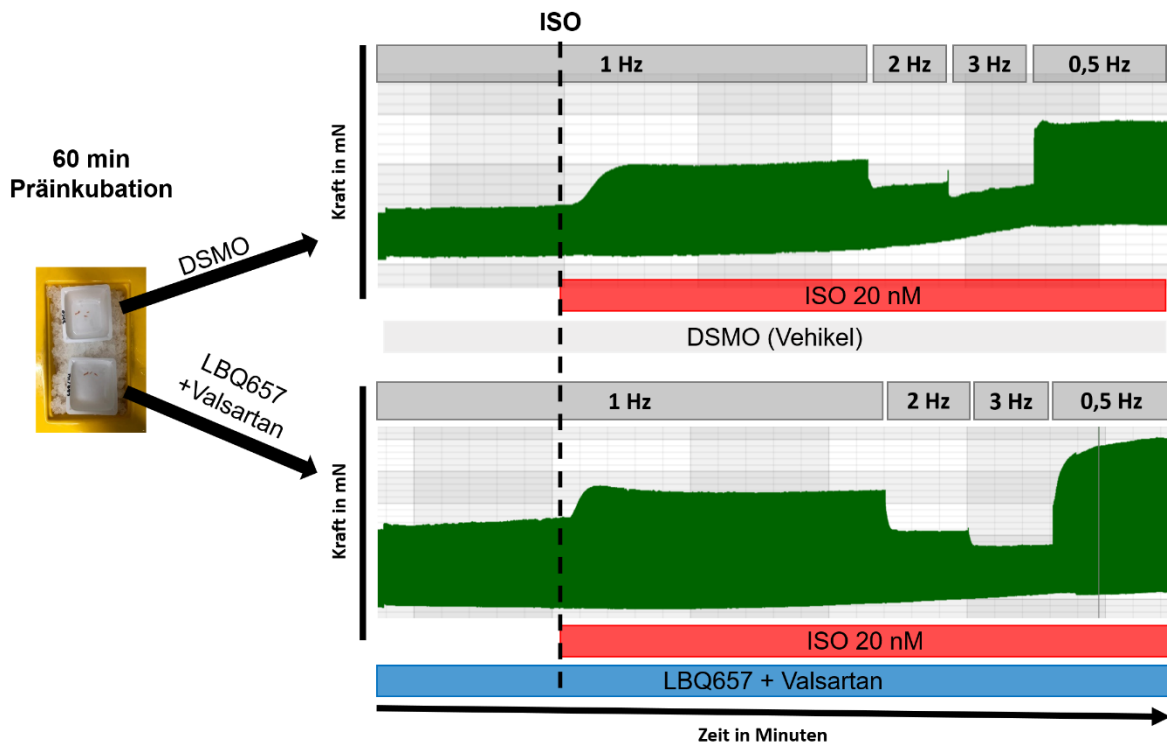


Abbildung 3-20: Beispielabbildungen aus dem Frequenzprotokoll mit Vehikel (DMSO)- oder LBQ657/Valsartan-Behandlung

Kontraktionsprofil der Kontrollgruppe (DMSO + ISO behandelte Muskelstreifen, oben) und der Interventionsgruppe (LBQ657/Valsartan + ISO behandelte Muskelstreifen, unten). Messungen vom 23.01.2020 (S1V1) und 30.01.2020 (S4V1).

ISO: Isoproterenol, LBQ657: Sacubitrilat, DMSO: Dimethylsulfoxid (Lösungsmittel)

3.6.1 Frequenzabhängige Effekte von LBQ657/Valsartan auf die entwickelte systolische Kraft

Unter ISO-Behandlung der mit DMSO beziehungsweise mit LBQ657 und Valsartan präinkubierten und behandelten Muskelstreifen kam es zu einer Zunahme der entwickelten Kraft ($p < 0,0001$, Abb. 3-21A) und einer Abnahme der TTP ($p < 0,0001$, 3-21B) und der HRT ($p = 0,001$, 3-21C). Die zusätzliche Behandlung der Muskelstreifen mit LBQ657 und Valsartan führte hingegen zu keiner signifikanten Veränderung der absolut entwickelten systolischen Kraft und weiterer Funktionsparameter vor und nach ISO-Gabe im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Muskelstreifen (Abb. 3-21).

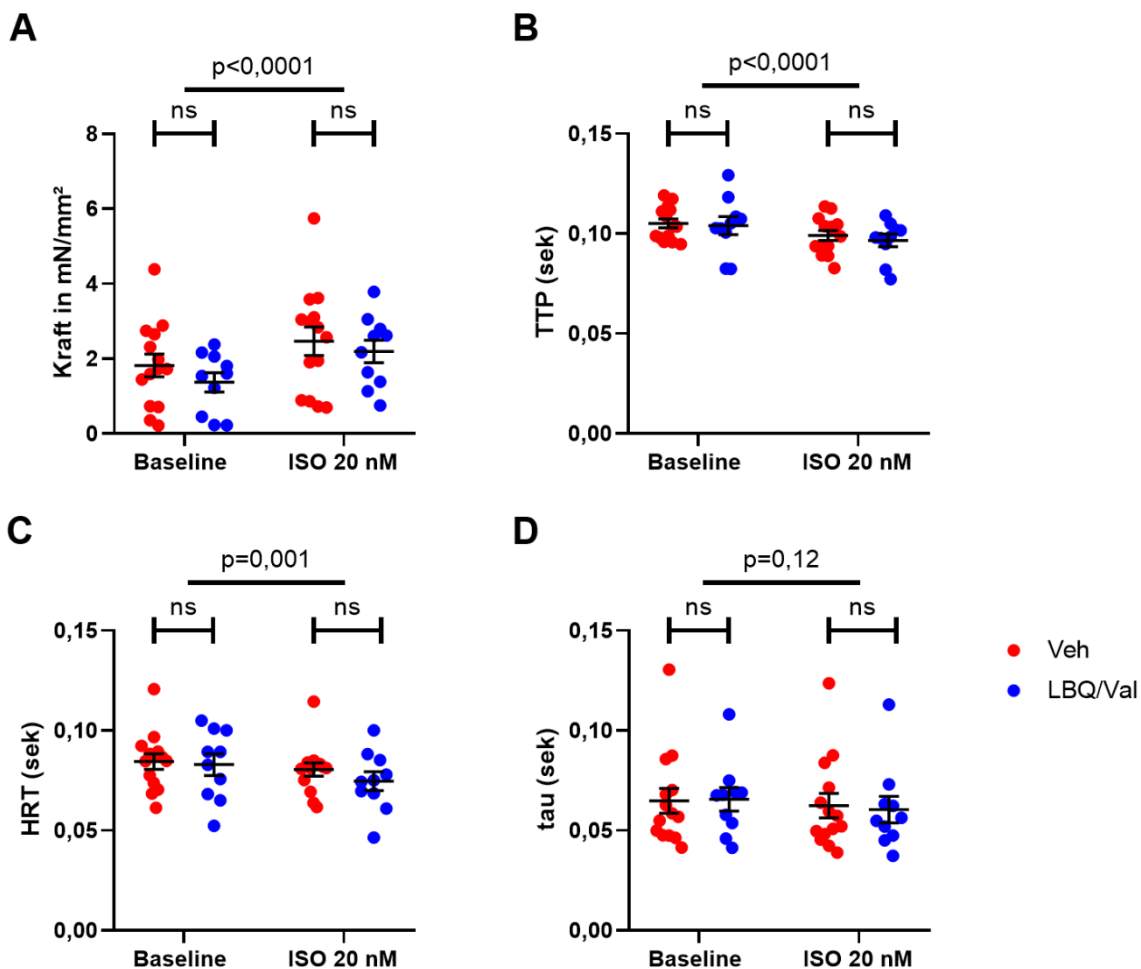


Abbildung 3-21: Anpassung der funktionellen Kontraktionsparameter von mit dem Vehikel (DMSO) oder LBQ657/Valsartan behandelten Muskelstreifen vor und nach ISO-Behandlung

Für die absolute entwickelte Kraft (A), die TTP (B), die HRT (C) und die Relaxationskonstante tau (D) zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen der mit dem Vehikel DMSO behandelten Kontrollgruppe und der mit LBQ657/Valsartan behandelten Interventionsgruppe vor und nach ISO-Behandlung (bei 1 Hz Stimulationsfrequenz). Es kann jedoch ein signifikanter ISO-abhängiger Effekt auf die entwickelte Kraft ($p < 0,0001$), die TTP ($p < 0,0001$) und die HRT ($p = 0,001$) gezeigt werden. Auch für die Relaxationskonstante tau zeigt sich ein Trend ($p = 0,12$) für einen ISO-abhängigen Effekt (alle Tests two-way ANOVA RM).

ISO: Isoproterenol, Veh: Vehikel (DMSO), LBQ: LBQ657/Sacubitrilat, Val: Valsartan, TTP: time to peak, HRT: half relaxation time, tau: Relaxationskonstante

3 Ergebnisse

Bei der basalen Stimulationsfrequenz von 1 Hz zeigte sich in der mit LBQ657 und Valsartan behandelten Gruppe zwar eine numerische Erhöhung der relativen entwickelten Kraft um 46 % unter ISO; diese war jedoch nicht signifikant (Abbildung 3-22A; $p=0,175$, t-Test). Höhere und geringere Stimulationsfrequenzen zeigten neben der bekannten frequenzabhängigen Veränderung der entwickelten Kraft (Abbildung 3-22B; $p<0,0001$, two-way ANOVA RM) ebenfalls keine signifikanten Effekte von LBQ657 und Valsartan auf die Inotropie atrialer Muskelstreifen. Auch weitere Parameter wie die TTP, HRT und tau wurden während der Variation der Stimulationsfrequenz nicht signifikant durch die zusätzliche Behandlung mit LBQ657 und Valsartan beeinflusst (Daten nicht abgebildet, alle ns).

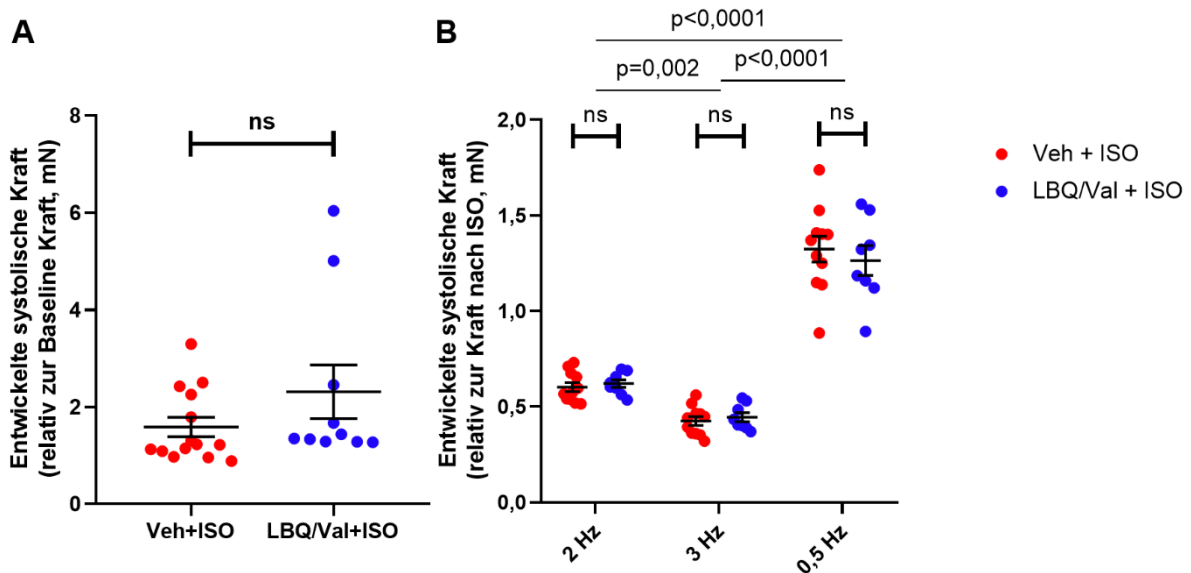


Abbildung 3-22: Allgemeine und frequenzabhängige Veränderung der entwickelten systolischen Kraft in mit Vehikel (DMSO) oder LBQ657/Valsartan behandelten Muskelstreifen unter ISO-Behandlung

(A) Relative entwickelte systolische Kraft 10 min nach ISO-Gabe bei 1 Hz Stimulationsfrequenz. Zur besseren Übersicht wurden die Werte auf die Baseline-Kraft des jeweiligen Muskelstreifens normalisiert. (B) Entwickelte Kraft bei variierenden Stimulationsfrequenzen. Zur besseren Darstellung wurden die Werte auf die systolische Kraft des jeweiligen Muskels 10 min nach ISO-Gabe bei 1 Hz normalisiert. Neben der frequenzabhängigen Veränderung der entwickelten Kraft ($p<0,0001$; two-way ANOVA RM) zeigt sich kein Effekt einer LBQ657/Valsartan Behandlung auf die Kraftentwicklung.

ISO: Isoproterenol, LBQ657/LBQ: Sacubitrilat, Val: Valsartan, Veh: Vehikel (DMSO)

(Übersetzt und angepasst aus Abbildung 2 in Primessnig & Deißler et al., 2022)

3.6.2 Frequenzabhängige Effekte von LBQ657/Valsartan auf die diastolische Spannung

Unter ISO-Behandlung fanden sich auch im vorliegenden Protokoll 4 weder in der DMSO-Gruppe, noch in der LBQ657 und Valsartan-Gruppe frequenzabhängige Unterschiede in der diastolischen Spannung. Außerdem wurden keine Unterschiede in der diastolischen Spannung zwischen Kontroll- und Interventionsgruppe festgestellt (two-way ANOVA RM, $p=0,30$, Abbildung 3-23A). Die Veränderung der diastolischen Spannung der einzelnen Streifen nach DMSO + ISO bzw. LBQ/Val + ISO über die Zeit wurde durch eine lineare Funktion angenähert. Hierbei fand sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (Abb. 3-23B, t-Test, $p=0,63$).

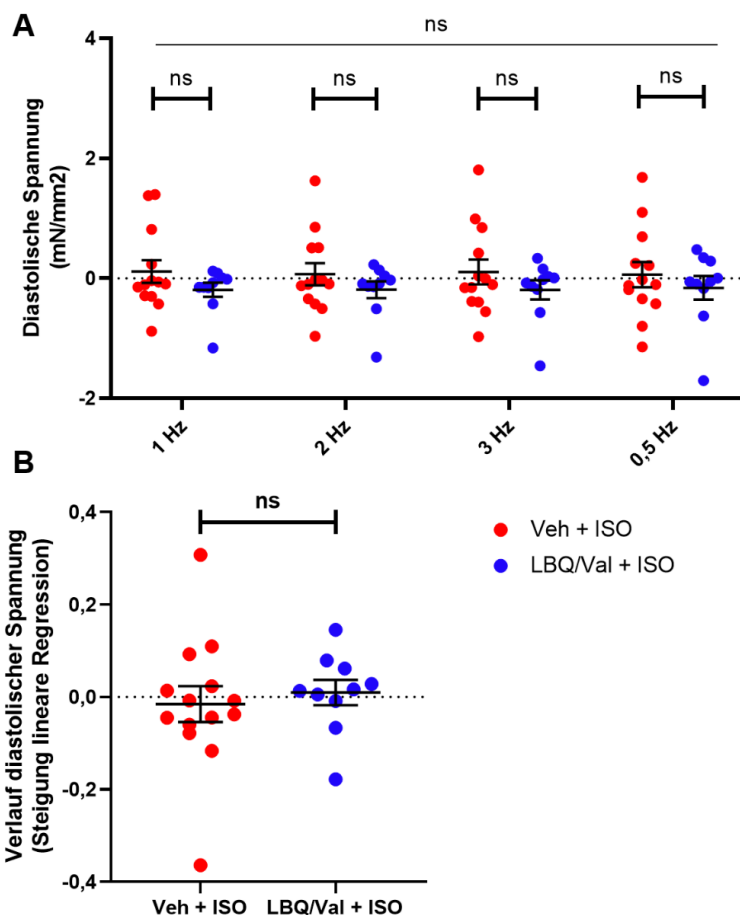


Abbildung 3-23: Effekt von Vehikel (DMSO) oder LBQ657/Valsartan auf die diastolische Spannung

(A) Es kann kein signifikanter Unterschied der diastolischen Spannung zwischen der Kontrollgruppe (DMSO + ISO) und der Interventionsgruppe (LBQ657/Valsartan + ISO) gezeigt werden ($p=0,3$, two-way ANOVA RM). Zur besseren Übersicht wurde die diastolische Spannung der Baseline auf 0mN angeglichen. (B) Auch in der Analyse des Anstiegs der diastolischen Spannung im Verlauf des Protokolls mittels linearer Regression beider Gruppen zeigt sich kein Unterschied ($p=0,63$, t-Test).

ISO: Isoproterenol, LBQ657/LBQ: Sacubitrilat, Val: Valsartan, Veh: Vehikel (DMSO)

(Übersetzt und angepasst aus Abbildung 2 in Primessnig & Deißler et al., 2022)

3.6.3 Frequenzabhängige Effekte von LBQ657/Valsartan auf die Entstehung von Arrhythmien

Das Auftreten von Arrhythmien wurde während jeder Stimulationsfrequenz erfasst (entsprechend während 1 Hz, 2 Hz & 3 Hz und 0,5 Hz). Zudem wurde ein gepoolter Gesamtwert der auftretenden Arrhythmien berechnet. Beispiele für beobachtete Arrhythmien während der Messungen sind in Abbildung 3-24 dargestellt.

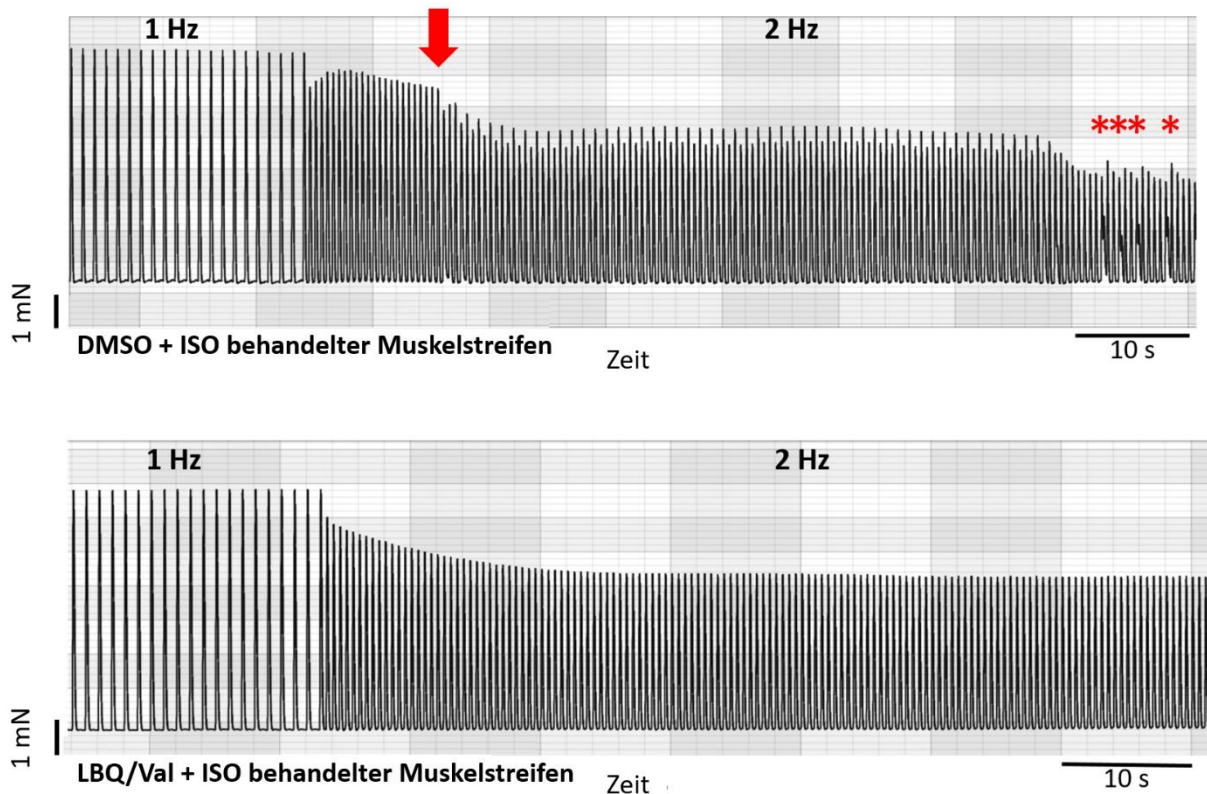


Abbildung 3-24: Beispielabbildungen von Arrhythmien im Rahmen des LBQ657/Valsartan-Frequenzprotokolls

Kontraktionskurven aus der Kontroll- und Interventionsgruppe während des Übergangs zwischen 1 Hz und 2 Hz Stimulationsfrequenz zu Beginn der Frequenzsteigerung im Messprotokoll. In der oben abgebildeten Kontraktionskurve eines Muskelstreifens aus der Kontrollgruppe mit DMSO (Vehikel)-Behandlung zeigt sich nach etwa 15 Sekunden nach Umstellung auf 2 Hz ein Alternieren der Kontraktionskraft mit intermittierenden Arrhythmien (roter Pfeil). Diese intermittierenden Arrhythmien sind insbesondere am Ende der Abbildung deutlich abgrenzbar (hervorgehoben mit roten Sternen). Im Vergleich zeigt die Abbildung unten im Bild mit LBQ657 und Valsartan-Behandlung keine Arrhythmien.

ISO: Isoproterenol, LBQ657/LBQ: Sacubitrilat, Val: Valsartan, Veh: Vehikel (DMSO)

(Übersetzt und angepasst aus Abbildung 3 in Primessnig & Deißler et al., 2022)

Interessanterweise zeigte sich bei höheren Stimulationsfrequenzen zu Beginn des Messprotokolls (gepoolt 1, 2 und 3 Hz) eine deutliche Verminderung der Arrhythmien in der mit LBQ657 und Valsartan behandelten Gruppe ($p=0,02$, Chi-Quadrat-Test): Während es in der mit dem Vehikel behandelten Gruppe in 38,1 % der Fälle zu

3 Ergebnisse

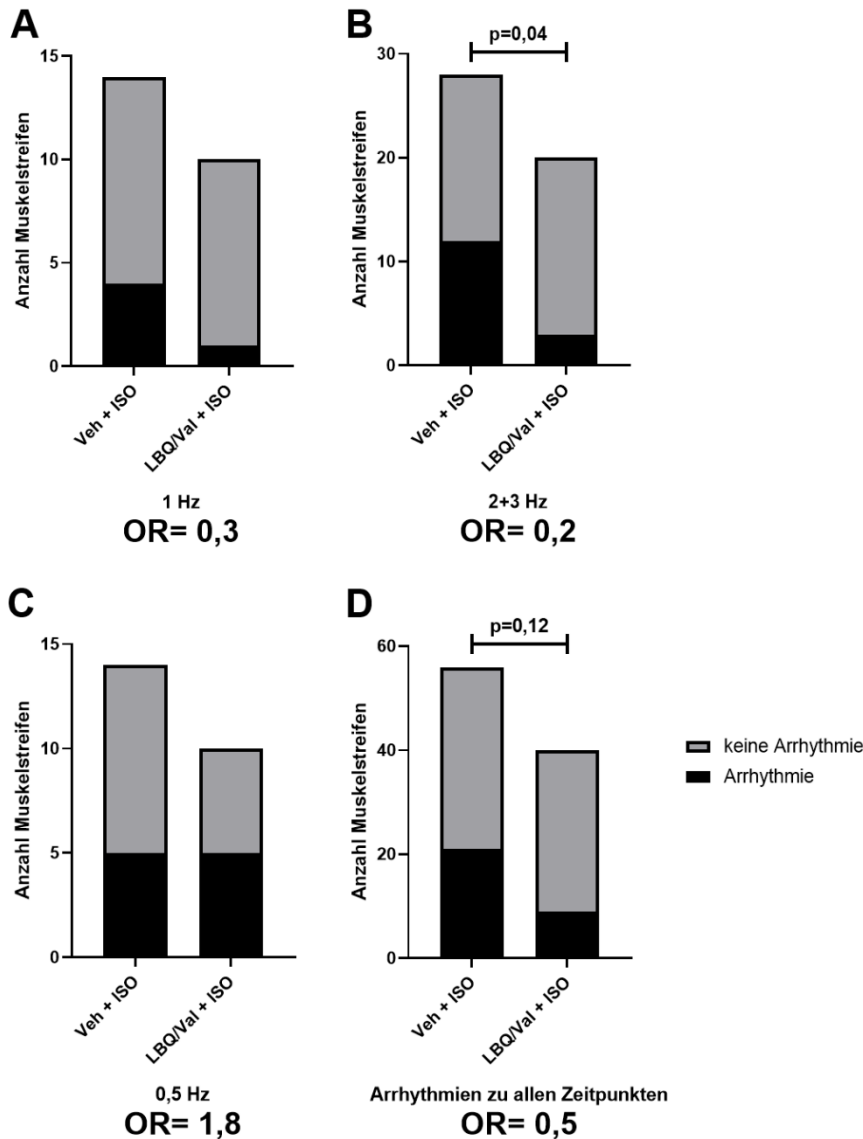


Abbildung 3-25: Anzahl arrhythmischer Muskelstreifen pro untersuchtem Zeitpunkt im LBQ657/Valsartan-Frequenzprotokoll

Anzahl arrhythmischer Muskelstreifen pro untersuchtem Frequenzbereich oder untersuchter Frequenz: (A) bei einer Frequenz von 1 Hz, (B) bei gesteigerten Stimulationsfrequenzen (2 Hz und 3 Hz), (C) bei einer Frequenz von 0,5 Hz, (D) gepoolte Analyse über alle Frequenzbereiche. Für höhere Stimulationsfrequenzen (2 und 3 Hz) zeigt sich eine signifikant verminderte Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Arrhythmien in der mit LBQ657/Valsartan behandelten Gruppe ($p=0,04$, Chi-Quadrat-Test). In der gepoolten Analyse zeigt sich zudem ein Trend hin zu einem verminderten Auftreten von Arrhythmien nach LBQ657/Valsartan-Behandlung ($p=0,12$, Chi-Quadrat-Test).

ISO: Isoproterenol, LBQ657/LBQ: Sacubitrilat, Val: Valsartan, Veh: Vehikel (DMSO), OR: Odds Ratio (3-25B und D übersetzt und angepasst aus Abbildung 3 in Primessnig & Deißler et al., 2022)

Arrhythmien kam, entwickelten sich nur 12,9 % der Fälle Arrhythmien in der mit LBQ657 und Valsartan behandelten Gruppe. Dies entsprach einer Odds-Ratio von 0,24 für die zusätzlich mit LBQ657 und Valsartan behandelten Gruppe (Daten nicht separat gezeigt). Besonders der Frequenzbereich von 2 und 3 Hz, welcher über der

3 Ergebnisse

basalen Stimulationsfrequenz von 1 Hz lag, zeigte mit einer Odds Ratio von 0,24 für die Behandlung mit LBQ657 und Valsartan eine relevante Verminderung des Auftretens von Arrhythmien (3-25B, $p=0,04$, Chi-Quadrat-Test).

In der Erholungsphase (0,5 Hz am Ende des Messprotokolls, siehe Abb. 42C) zeigte sich hingegen kein antiarrhythmischer Effekt der Behandlung mit LBQ657 und Valsartan mehr.

Insgesamt zeigt sich für die zusätzliche Behandlung mit LBQ657/Valsartan ein Trend ($p=0,12$, OR= 0,48; siehe Abbildung 3-25D) hin zu einer Verminderung des Auftretens von Arrhythmien. Während in der Kontrollgruppe in 37,5 % der untersuchten Zeitpunkte Arrhythmien festgestellt wurden, zeigten sich in der zusätzlich mit LBQ657/Valsartan behandelten Gruppe lediglich in 22,5 % der Fälle Arrhythmien, was einem Trend zur Reduktion des Auftretens von Arrhythmien um 40 % entspricht.

3.7 Molekularbiologische Untersuchung der Muskelstreifen und myokardialer Biopsien

3.7.1 VASP Phosphorylierung in atrialen Muskelstreifen nach LBQ657/Valsartan-Behandlung

Alle Muskelstreifen wurden nach Abschluss der Messungen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ für weitere Untersuchungen eingelagert. Um zu untersuchen, in wieweit die cGMP/PKG-Signalkaskade durch die Behandlung mit LBQ657 und Valsartan beeinflusst wird, wurde die Phosphorylierung des Vasodilatator-stimulierten Phosphoproteins (VASP) an Serin-157 und Serin-239 als Surrogatparameter für die Aktivierung der PKG bestimmt (Borgognone et al., 2014; Sartoretto et al., 2009). Insbesondere die Phosphorylierung an Serin-239 ist ein etablierter Marker für die von NPs über den cGMP/PKG-Signalweg vermittelte VASP-Phosphorylierung (Sartoretto et al., 2009). Für die vorliegende Analyse wurden Muskelstreifen von $N=5$ Patient:innen aus den in Sektion 3.6 gezeigten Versuchen der Kontroll- und der Interventionsgruppe untersucht. Es zeigte sich jedoch an beiden VASP-Phosphorylierungsstellen kein signifikanter Unterschied zwischen den mit dem Vehikel (DMSO) und den mit LBQ657 und Valsartan behandelten Muskelstreifen (siehe Abbildung 3-26).

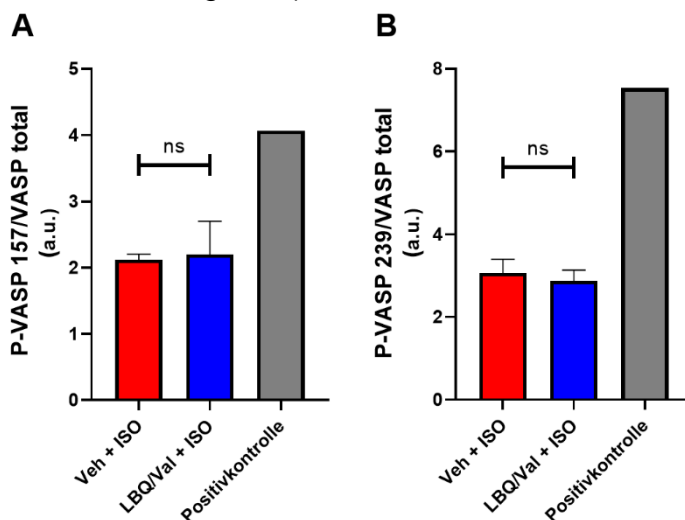


Abbildung 3-26: VASP-Phosphorylierung an Serin-157 und Serin-239 als Surrogatparameter für die cGMP/PKG-Aktivierung nach Behandlung mit Vehikel (DMSO) oder LBQ657/Valsartan

Weder für Serin-157 (A) noch für Serin-239 (B) zeigt sich eine Zunahme der VASP-Phosphorylierung durch die Behandlung mit LBQ657 und Valsartan (ns, t-Test). Die Phosphorylierung wird in der Abbildung in Relation zur Gesamtkonzentration von VASP angegeben. Als Positivkontrolle diente eine Gewebeprobe, welche für eine Dauer von 10 Minuten mit 200 nM ISO behandelt wurde.

P-VASP: phosphoryliertes VASP, Veh: Vehikel, ISO: Isoproterenol, LBQ657/LBQ: Sacubitrilat, Val: Valsartan, a.u.: arbitrary units (beliebige Einheiten)

(Übersetzt und angepasst aus Supplement Abbildung 3 in Primessnig & Deißler et al., 2022)

3.7.2 Neprilysin-Expression in rechtsatrialen und linksventrikulären Biopsien

Die Ergebnisse der vorherigen Experimente legten nahe, dass eine Inhibition von NEP bei gleichzeitiger Behandlung mit Valsartan zu einem verminderten Auftreten von Arrhythmien führen könnte. Inwieweit sich die NEP-Expression im Verlauf einer Herzinsuffizienz jedoch verändert/angepasst, ist in der aktuellen Literatur nicht abschließend geklärt. Zudem liegen bis dato keine quantitativen Daten zur Expression von NEP im menschlichen Vorhof vor. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit neben den beschriebenen funktionellen Messungen auch die atriale und als Referenz auch die ventrikuläre Expression von NEP mittels ELISA quantifiziert.

Atriale und ventrikuläre Proben von N=10 Patient:innen mit terminaler Herzinsuffizienz, welche sich entweder einer Herztransplantation (70 %) oder der Implantation eines linksventrikulären Assistenzsystems (30 %) unterzogen, wurden für die molekularbiologische Analyse eingeschlossen. Die Biopsien wurden im Rahmen des jeweiligen Eingriffs gewonnen und bis zur molekularbiologischen Untersuchung bei -80 °C gelagert.

Es handelte sich um ein Patient:innenkollektiv mit einem medianen Alter von 52 Jahren, welches zu gleichen Teilen aus Männern und Frauen zusammengesetzt war. Als Hauptursachen der Herzinsuffizienz der Gruppe wurden eine ischämische (40 %) und eine dilatative (30 %) Kardiomyopathie identifiziert.

Alle eingeschlossenen Patient:innen waren an einer terminalen Herzinsuffizienz mit stark eingeschränkter LVEF (im Median 20 %) erkrankt; 50 % der Patient:innen litten zudem an Vorhofflimmern. Sonographisch waren bei den Patient:innen deutlich dilatierten Kammern und eine global eingeschränkte Herzfunktion nachweisbar. Als laborchemischer Parameter der Herzinsuffizienz war zum Zeitpunkt der Operation zudem war das NT-proBNP im Plasma der Patient:innen mit >2800 pg/ml im Median (Durchschnitt >6700 pg/ml) stark erhöht.

Eine genaue Charakterisierung der Patient:innen findet sich nachfolgend in Tabelle 3-3 und Tabelle 3-4.

3 Ergebnisse

Tabelle 3-3: Patient:innencharakteristika der NEP-ELISA Kohorte

Patient:innen Charakteristika			
<u>allg. Charakteristika</u>		<u>Medikation</u>	
Alter	52 (45-56)	ACE-Hemmer/ AT1-RB	70 %, 7/10
Geschlecht (männlich)	50 %, 5/10	β-Blocker	80 %, 8/10
BMI	23 (21-31)	Diuretikum	80 %, 8/10
Herzinsuffizienz	100 %, 10/10	MRI	80 %, 8/10
arterieller Hypertonus	30 %, 3/10	ARNIs	10 %, 1/10
Dyslipidämie	60 %, 6/10	Digitoxin	10 %, 1/10
Adipositas	30 %, 3/10	Ca ²⁺ -Kanal-Antagonist	10 %, 1/10
Diabetes Mellitus	30 %, 3/10	Amiodaron	30 %, 3/10
koronare Herzerkrankung	60 %, 6/10	Statin	60 %, 6/10
Vorhofflimmern	50 %, 5/10	orales Antidiabetikum	10 %, 1/10
COPD	20 %, 2/10	<u>OP Verfahren</u>	
chronische Niereninsuffizienz	30 %, 3/10	Herztransplantation	70 %, 7/10
kardiale Voroperation (Bypass, Klappen-Op)	40 %, 4/10	LVAD Implantation	30 %, 3/10
Implantat (ICD, PM)	80 %, 8/10		
pulmonal-arterieller Hypertonus	40 %, 4/10		
<u>Hauptdiagnose</u>			
ischämische KM	40 %, 4/10		
dilatative KM	30 %, 3/10		
Myokarditis	20 %, 2/10		
restriktive KM	10 %, 1/10		

Abgebildet sind allgemeine Patient:innencharakteristika, Hauptdiagnosen, Medikationen, Vorerkrankungen und durchgeführte OP-Verfahren. Die Werte werden entweder als Median (mit interquartiler Spanne) oder als Prozentwert (mit dem absoluten Anteil am Gesamtkollektiv) angegeben.

BMI: Body Mass Index, COPD: Chronisch-obstruktive Lungenerkrankung, ICD: implantierbarer Kardioverter-Defibrillator, PM: Schrittmacher, KM: Kardiomyopathie, MRI: Mineralocorticoid Rezeptor Inhibitor, ARNI: Angiotensin-Rezeptor Neprilysin-Inhibitor, LVAT: linksventrikuläres Assistenzsystem

(Übersetzt und angepasst aus Supplement Tabelle 1 in Primessnig & Deißler et al., 2022)

3 Ergebnisse

Tabelle 3-4: Echokardiographische Parameter zum Zeitpunkt der Operation der NEP-ELISA Kohorte

Echokardiographie Parameter	Median (IQR)	Parameter-Bestimmung möglich
LVEF (%)	20 (15-26)	N=10
LVEDD (mm)	68 (60-82)	N=10
IVSd (mm)	12 (10-13)	N=10
PWd (mm)	10 (8-12)	N=10
LA Volumen biplan (ml)	106 (78-122)	N=10
LAVI (ml/m ²)	51 (40-61)	N=10
LA Diameter (mm)	46 (41-50)	N=10
LA emptying fraction (norm >37%)	27 (18-34)	N=10
LA Strain (>23% norm)	11 (7-16)	N=9
RVEF (%)	37 (33-41)	N=10
RA Fläche (cm ²)	23 (17-33)	N=10
RA Diameter (mm)	44 (30-52)	N=10
RA emptying fraction (norm >37%)	31 (29-38)	N=8
RA Strain Reservoir+Conduit	19 (16-40)	N=6
TAPSE (mm)	14 (13-16)	N=9
RVEDD (mm)	40 (33-49)	N=10
sPAP (mmHg)	38 (35-44)	N=4

Die Werte werden als Median (mit interquartiler Spanne, IQR) angegeben. Da die Qualität der echokardiographischen Aufnahmen nicht immer ausreichend war, wird auf der rechten Spalte der Tabelle die Anzahl an Patient:innen angegeben, bei der eine Bestimmung der Parameter möglich war.

LVEF: linksventrikuläre Ejektionsfraktion, LVEDD: linksventrikulärer enddiastolischer Diameter, IVSd: diastolischer ventrikulärer Septumdiameter, PWd: diastolischer Diameter der posterioren Wand, LA: linksatrial, LAVI: linksatrialer Volumenindex, RA: rechtsatrial, TAPSE: tricuspid annular plane systolic excursion, RVEDD: rechtsventrikulärer enddiastolischer Diameter, sPAP: systolischer pulmonalarterieller Druck

(Übersetzt und angepasst aus Supplement Tabelle 1 in Primessnig & Deißler et al., 2022)

3 Ergebnisse

In der Analyse mittels ELISA zeigte sich, dass NEP in gleicher Konzentration im atrialen und ventrikulären Myokard exprimiert war (siehe Abb. 3-27A). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass ein signifikanter Zusammenhang zwischen RA und LV NEP-Expression besteht (Abb. 3-27C; $r=0,73$, $p=0,017$; Pearson R).

Neben dieser allgemeinen Analyse zeigte sich auch ein relevanter Zusammenhang zwischen kardialen Funktionsparametern und der NEP-Expression.

Das LA-Volumen (als indirekter Parameter für die LV-Vorlast) korrelierte invers mit der LV NEP-Expression (Abb. 3-27B; $r=-0,69$; $p=0,039$, Pearson R). Eine steigende LV-Vorlast war somit mit einer reduzierten NEP-Expression assoziiert.

Zudem zeigte sich ein Zusammenhang zwischen RA-Funktion und der RA NEP-Expression: Eine verringerte RAEF und ein verminderter RA Strain waren beide mit einer Reduktion von NEP im rechten Atrium assoziiert. Sowohl die Korrelation des RA NEP und der RAEF (Abb. 3-27D, $r=0,806$, $p=0,016$, Pearson R) als auch die Korrelation des RA NEP und des RA Strain ($r=0,717$, $p=0,11$, Pearson R) deuteten in diesem Kontext auf einen Zusammenhang zwischen der NEP-Expression und der RA Funktion hin.

In einer letzten Analyse konnte schließlich gezeigt werden, dass eine höhere klinische NYHA-Klasse mit einer Verminderung des RA NEP einherging (Abb. 3-27E; $r=-0,81$, $p=0,009$, Spearman R).

3 Ergebnisse

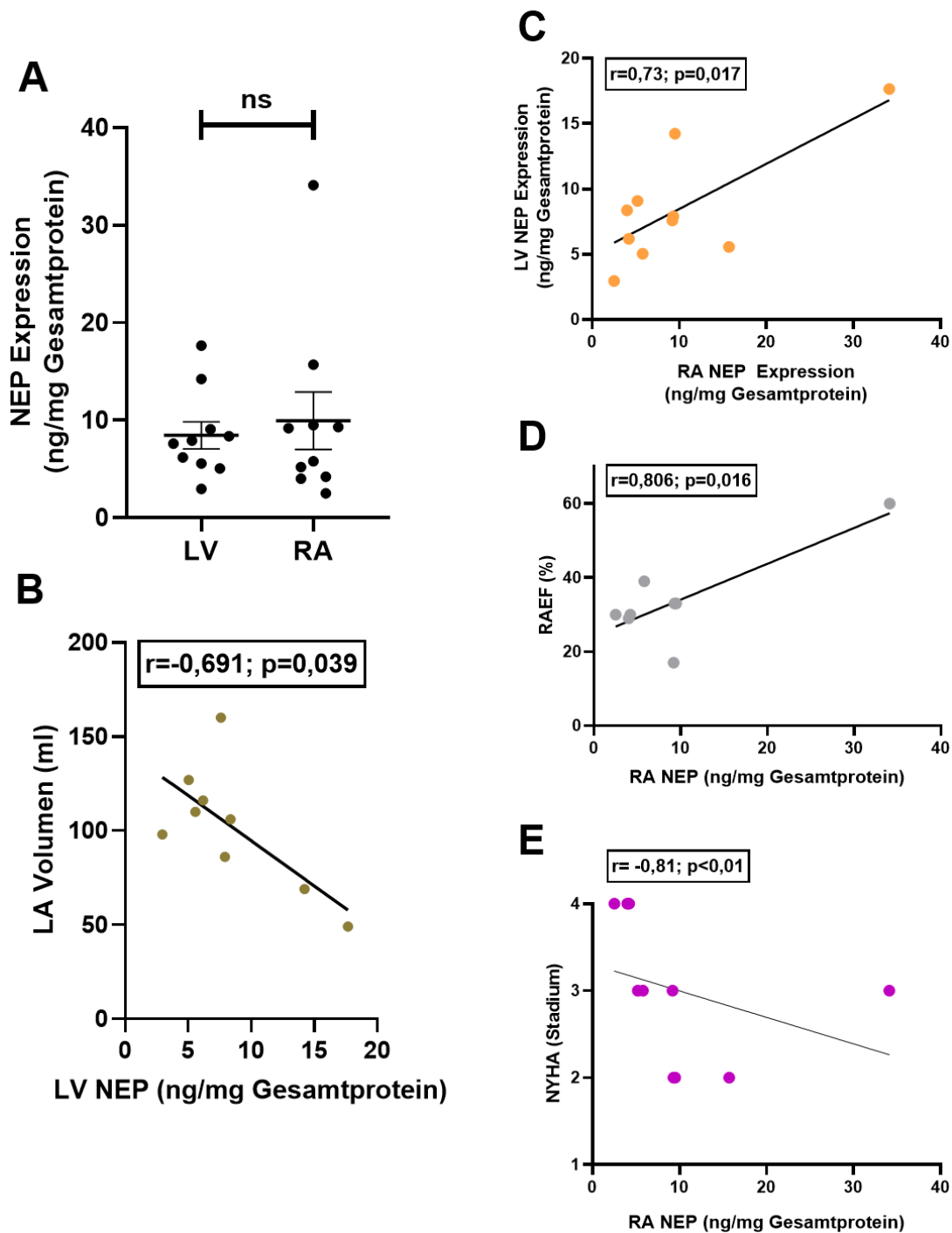


Abbildung 3-27: NEP-Expression in rechtsatrialen und linksventrikulären Biopsien von Patient:innen mit terminaler Herzinsuffizienz

Es zeigt sich, dass die NEP-Expression sich zwischen Atrium und Ventrikel nicht signifikant unterscheidet (A), dass aber ein genereller, patientenabhängiger Zusammenhang zwischen der NEP-Expression im RA und dem LV besteht (C). Zudem ließ sich ein Zusammenhang zwischen dem LA Volumen und der NEP-Expression im LV (B) und der RA Funktion und der NEP Expression im RA (D) nachweisen. Interessanterweise zeigt sich auch ein Zusammenhang der klinischen Symptomschwere der Patient:innen (erfasst durch NYHA) und der RA NEP-Expression (E).

NEP: Nephilysin, RA: rechtsatrial, LV: linksventrikulär, EF: Ejektionsfraktion, NYHA: New York Heart Association

(Übersetzt und angepasst aus Abbildung 4 und Supplement Abbildung 4 in Primessnig & Deißler et al., 2022)

4 Diskussion

4.1 Kurzzusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte von BNP und LBQ657 ± Valsartan auf die atriale Kontraktilität und Arrhythmogenese unter ISO-Behandlung in einem humanen in-vitro Modell untersucht. Zudem wurde die NEP-Expression in atrialen und ventrikulären Biopsien von Patient:innen mit terminaler Herzinsuffizienz sowie ihre Korrelation mit dem klinischen Phänotyp der Patient:innen bestimmt.

Es konnte gezeigt werden, dass eine akute Anwendung von BNP und LBQ657 ± Valsartan im untersuchten Zeitraum keinen zusätzlichen Effekt auf die funktionelle Reserve unter ISO-Behandlung bewirkt. Ein Effekt von BNP auf die diastolische Spannung der Muskelstreifen konnte jedoch sowohl bei konstanter Stimulationsfrequenz (1 Hz), als auch bei Variation der Stimulationsfrequenz nachgewiesen werden. Zudem führte eine Behandlung mit BNP und LBQ657 + Valsartan zu einer relevanten Verminderung des Auftretens von Arrhythmien unter ISO-Gabe. Es fand sich eine signifikante interindividuelle Korrelation zwischen dem Plasma NT-proBNP-Spiegel der Patient:innen (als Surrogat-Parameter der Plasma-BNP-Konzentration) und dem ISO-induzierten Kraftanstieg der Muskelstreifen.

Schließlich zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen funktionellen Markern der myokardialen (Dys-)Funktion und der NEP-Expression in atrialen und ventrikulären Biopsien einer Patient:innenkohorte mit terminaler Herzinsuffizienz.

Eine Übersicht der Ergebnisse ist in Abbildung 4-1 dargestellt.

Die Effekte des Natriuretischen Peptid Systems auf die atriale Funktion und Arrhythmogese

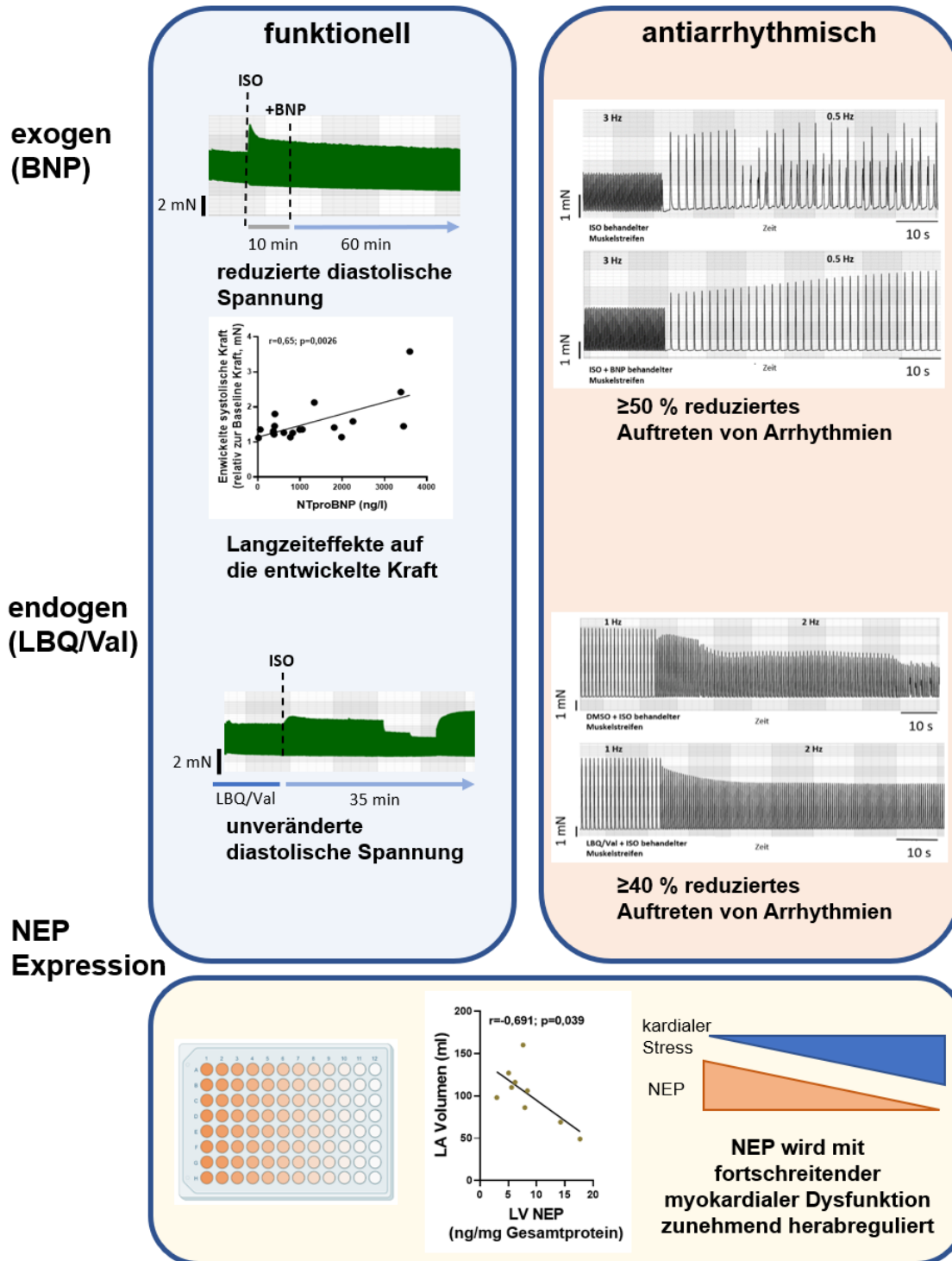


Abbildung 4-1: Zusammenfassung der Ergebnisse der Arbeit

ISO: Isoproterenol, BNP: Brain Natriuretic Peptide, LBQ/LBQ657: Sacubitrilat, Val: Valsartan, NEP: Nephilysin

4.2 Inotrope Effekte von BNP und LBQ657 ± Valsartan

Im Rahmen einer Herzinsuffizienz kommt es zu einem (vermutlich kompensatorischen) Anstieg der NP-Konzentration im Blutplasma. Physiologisch sind die NPs mit positiven Effekten auf arteriellen Blutdruck, Myokardfibrose und Myokardhypertrophie assoziiert (Goetze et al., 2020; Kerkelä et al., 2015).

Bezüglich der direkten Effekte der NPs auf die myokardiale Funktion und Reservekapazität besteht jedoch Unklarheit: In einer Arbeit von Meulemans et al. aus dem Jahr 1988 wurde ein dosisabhängiger negativ-inotroper Effekt von ANP auf rechtsventrikuläre Katzen-Papillarmuskeln gezeigt. Dieser negativ-inotrope Effekt war zudem mit einer Reduktion der TTP und der HRT assoziiert (Meulemans et al., 1988). Ein negativ-inotroper Effekt von ANP wurde darüber hinaus auch in humanen, atrialen Muskelpräparationen beschrieben (Kockskämper et al., 2008). Neben ANP konnte auch bei Anwendung von CNP in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten ein negativ-inotroper Effekt gezeigt werden (Nir et al., 2001).

Diesen Hinweisen auf einen negativ-inotropen Effekt der NPs steht eine Studie von Chen et al. gegenüber. Die Autor:innen konnten in einem in-vivo Herzinsuffizienz-Hundemodell zeigen, dass es 30 Minuten nach subkutaner Injektion einer hohen BNP-Dosis (25µg/kg) zu einer deutlichen Zunahme des Herzzeitvolumens und einer Verminderung des mittleren arteriellen Blutdrucks kam (Chen et al., 2000). Eine Studie von Perera et al. aus dem Jahr 2015 lieferte zudem einen möglichen Erklärungsansatz für diese potenziellen direkten positiv-inotropen Effekte der NPs auf zellulärer Ebene: Die Autor:innen zeigten in ventrikulären Kardiomyozyten eines Maus-Modells früher myokardialer Hypertrophie (induziert durch chirurgische transversale Aortenverengung) eine verstärkte Sarkomerverkürzung nach Behandlung mit 100 nM ANP. Diese Effekte traten innerhalb von Sekunden nach Zugabe des ANPs auf, jedoch nur, wenn die Kardiomyozyten mit dem β -Adrenorezeptor-Agonisten ISO vorbehandelt waren. Durch weitere funktionelle Untersuchungen identifizierten die Autor:innen als Ursache des positiv-inotropen Effekts unter ISO eine veränderte Interaktion zwischen dem cGMP/PKG- und dem cAMP/PKA-Signalweg in den Kardiomyozyten bei früher kardialer Hypertrophie. Als Grundlage dieser veränderten Interaktion wurde eine räumliche Umverteilung der cGMP sensitiven PDE2 und PDE3 ermittelt, welche eine

4 Diskussion

cGMP-abhängige Modulation der β 1-AR-cAMP-Level mit einhergehenden positiv-inotropen Effekten bewirkte (Perera et al., 2015).

Die daraus abgeleitete Frage, ob NPs durch eine Modulation der funktionellen Reserve unter ISO-Behandlung und bei anschließender Variation der Stimulationsfrequenzen zu einer verbesserten atrialen/myokardialen Funktion beitragen, wurde in dieser Arbeit untersucht.

Um den maximalen NP-Effekt auf die funktionelle Reserve unter ISO und unterschiedliche Stimulationsfrequenzen zu untersuchen, wurden die Muskelstreifen exogen mit 100 nM BNP (analog zur von Perera et al., 2015 gewählten ANP-Konzentration) behandelt. Bei einer basalen Stimulationsfrequenz von 1 Hz zeigte sich kein kurzfristiger BNP-Effekt auf die funktionelle Reserve. Im Gegensatz zu Meulemans et al. 1988 fand sich zudem ein Trend ($p=0,067$, siehe 3.3.1) hin zu einer verlängerten TTP in den zusätzlich mit BNP behandelten Muskelstreifen. Bei einer durchschnittlichen numerischen Verlängerung der TTP um 0,7 ms unter BNP-Behandlung kann jedoch von keinem funktionell relevanten Effekt ausgegangen werden. Auch bei einer Variation der Stimulationsfrequenz auf 2 Hz, 3 Hz und 0,5 Hz unter ISO zeigte sich kein Effekt einer zusätzlichen BNP-Gabe auf die entwickelte Kraft und auf weitere Funktionsparameter wie HTTP, TTP, HRT oder tau.

Bei der Untersuchung des Effekts einer NEP-Blockade durch LBQ657 (entweder alleine oder kombiniert mit dem AT₁-Blocker Valsartan) auf die inotrope Reserve unter ISO und bei variierenden Stimulationsfrequenzen wurde berücksichtigt, dass die endogene Freisetzung von NPs aus dem Myokard unter anderem durch eine Dehnung des Muskels und durch adrenerge Stimulation bewirkt wird (Agnoletti et al., 1992; Schiebinger und Greening, 1992). Aus diesem Grund wurde durch die einstündige Präinkubation mit LBQ657 \pm Valsartan eine ausreichende NEP-Inhibition bereits vor den NP freisetzenden Stimuli gewährleistet, um die parakrin in den Muskelpräparaten verfügbare NP-Konzentration zu maximieren. Da die Behandlung mit LBQ657 \pm Valsartan entsprechend der zugelassenen therapeutischen Plasmadosis erfolgte, wurde der Abbau der NPs jedoch nur im Rahmen einer klinisch verwendeten Dosis inhibiert. Potenzielle Effekte darüber hinaus gehender Dosierungen wurden nicht untersucht. Auch für LBQ657 \pm Valsartan konnte kein Effekt auf die funktionelle Reserve unter ISO und auf weitere Kontraktionsparameter während variierender

4 Diskussion

Stimulationsfrequenzen nachgewiesen werden. Das Fehlen der positiv-inotropen bzw. inotropie-modulierenden Effekte von BNP und LBQ657 ± Valsartan unter ISO-Behandlung kann potenziell auf verschiedene Faktoren zurückgeführt werden, die im Folgenden erläutert werden.

Zunächst könnten biologische Unterschiede Grund für das Fehlen eines positiv-inotropen Effekts von BNP, LBQ657 und LBQ657 + Valsartan (siehe 3.3.1, 3.4.1, 3.5.1 und 3.6.1) im untersuchten Modell sein: Während in der vorliegenden Studie atriale Proben untersucht wurden, untersuchte die Studie von Perera et al. (2015) die Effekte in ventrikulären Kardiomyozyten, welche in Bezug auf Struktur und Funktion deutliche Unterschiede aufweisen. Da NPs vor allem in spezialisierten atrialen Kardiomyozyten synthetisiert werden (Goetze et al., 2020) und im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine Unterschiede in der atrialen und ventrikulären NEP-Expressionen nachgewiesen wurden, war ein maximaler Effekt der NEP-Inhibition durch LBQ657 auf eine Erhöhung der NP-Gewebskonzentration im untersuchten atrialen Myokard zu erwarten. Die Hypothese, dass die exogene Erhöhung der verfügbaren NPs im atrialen Gewebe durch BNP-Behandlung zu einer Zunahme der Inotropie führen würde, konnte jedoch nicht bestätigt werden (siehe 3.3.1 und 3.4.1). Entsprechend wurde auch kein zusätzlicher inotroper Effekt durch die Erhöhung der Konzentration der endogen synthetisierten und freigesetzten NPs durch NEP-Inhibition nachgewiesen (siehe 3.5.1 und 3.6.1).

Neben den funktionellen Unterschieden zwischen atrialem und ventrikulärem Myokard könnten zudem auch Unterschiede zwischen murinen und humanen Kardiomyozyten als mögliche Erklärung für fehlende inotrope Effekte in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen aufgeführt werden. Dies wird durch Daten von Kockskämper et al. aus dem Jahr 2008 gestützt, welche in humanen atrialen Muskelpräparaten ohne ISO-Behandlung einen negativ-inotropen Effekt einer ANP-Behandlung gezeigt haben (Kockskämper et al., 2008). Unter ISO-Behandlung war ein solcher negativ-inotroper Effekt von BNP in dieser Arbeit nicht nachweisbar.

Zudem ist anzuführen, dass die in der vorliegenden Studie eingeschlossenen Patient:innen vor allem an chronischen Herzerkrankungen mit chronischer myokardialer Hypertrophie und nicht an früher kardialer Hypertrophie wie das von Perera et al. untersuchte Tiermodell litten (vgl. 3.2). 88 % der eingeschlossenen

4 Diskussion

Patient:innen litten an einer koronaren Herzerkrankung (*KHK*) und 76 % an einem arteriellen Hypertonus. Insbesondere der hohe Anteil von Patient:innen mit arteriellem Hypertonus und mit Herzinsuffizienz (29 %) spricht für eine Kohorte mit chronischer Herzerkrankung, in deren Verlauf es auch zu einer linksventrikulären Hypertrophie kam (Median interventrikulärer Septumdiameter: 13 mm, Median linksventrikuläre posteriore Wanddicke: 12 mm). Die Atrien der eingeschlossenen Patient:innen wiesen jedoch mehrheitlich keine Vergrößerung oder Hypertrophie auf (medianer Diameter: RA: 35 mm; LA: 38 mm) (Primessnig & Deißler et al., 2022).

Da in der vorliegenden Arbeit Vorhofbiopsien von Patient:innen mit zumeist langbestehender Herzerkrankung verwendet wurden, besteht zudem die Möglichkeit, dass es im untersuchten atrialen Gewebe zu einer Desensitivierung des NP-Signalwegs kam. Die Desensitivierung der NP-Signalwege bei fortschreitender Herzinsuffizienz ist vor allem auf eine Herabregulation und Desensitivierung der NP-Rezeptoren, eine Einschränkung des intrazellulären NP-Signalwegs (z.B. durch verminderte cGMP-Synthese oder veränderte PDE-Expression) und eine verminderte Aktivierung der BNP-Vorläuferaktivierung zurückzuführen (Blanton, 2020; Forfia et al., 2007; Hubers und Brown, 2016; Huntley et al., 2015). Die beiden erstgenannten Punkte könnten auch eine Rolle in den in dieser Arbeit verwendeten Gewebeproben spielen und eine Einschränkung der NP-Wirkung in den verwendeten Proben erklären (Primessnig & Deißler et al., 2022). Im von Perera et al. 2015 verwendeten Modell einer frühen myokardialen Hypertrophie ist hingegen anzunehmen, dass es (noch) zu keiner signifikanten Einschränkung der NP-Rezeptorfunktion und des intrazellulären Signalwegs kam.

Eine letzte, wenn auch unwahrscheinliche, Erklärung des Fehlens eines positiv-inotropen Effekts von BNP auf atriale Muskelpräparationen könnte sein, dass nur ANP und nicht BNP (bzw. CNP) eine solche positiv-inotrope Wirkung unter ISO-Gabe aufweist und dass die durch LBQ657 ± Valsartan bewirkte Steigerung der ANP-Konzentration nicht ausreichend war, um die positiv-inotropen Effekte zu reproduzieren (Primessnig & Deißler et al., 2022). Da ANP und BNP jedoch dieselben Rezeptoren binden und dieselben Signalwege bedienen (Potter et al., 2006), wurde diese Hypothese in der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht. Es ist in diesem Kontext jedoch anzumerken, dass in der Literatur eine höhere Bindungsaffinität von

4 Diskussion

ANP an den NPR-A und an NEP beschrieben ist (Goetze et al., 2020; Hubers und Brown, 2016).

Insgesamt konnte in atrialen Präparationen kein kurzfristiger positiv-inotroper Effekt von BNP, LBQ657 oder LBQ657 + Valsartan auf die funktionelle Reserve und während variierender Stimulationsfrequenzen gezeigt werden (siehe 3.3.1, 3.4.1, 3.5.1 und 3.6.1). Aufgrund der geringen verwendeten ISO-Dosis (20 nM) ist es unwahrscheinlich aber nicht ausgeschlossen, dass die maximale Inotropie bereits durch ISO erreicht wurde, sodass BNP keine zusätzlichen Effekte mehr entfalten konnte. Eine Verbesserung der kardialen Pumpfunktion durch direkte kurzfristige Effekte des NP-Signalwegs scheint aber insgesamt im untersuchten Modell unwahrscheinlich. Diese Erkenntnis deckt sich mit den Ergebnissen funktioneller Messungen der LBQ657-Wirkung in ventrikulären Muskelstreifenpräparaten von Patient:innen mit terminaler Herzinsuffizienz. Diese zeigten, dass LBQ657 im untersuchten Zeitraum die Kontraktilität nicht signifikant beeinflusst (Eiringhaus et al., 2020).

Im Gegensatz zu den oben zitierten Studien zur negativ-inotropen ANP- und CNP-Wirkung in verschiedenen in-vitro Modellen (Kockskämper et al., 2008; Meulemans et al., 1988; Nir et al., 2001) wurde in der vorliegenden Arbeit unter ISO-Behandlung jedoch auch kein negativ-inotroper Effekt nachgewiesen.

Interessanterweise zeigten die Analysen dieser Arbeit jedoch einen positiven Zusammenhang zwischen der relativen Kraftzunahme unter ISO-Stimulation und der Patient:innen-Plasmakonzentration von NT-proBNP (einem indirekten Marker der Menge an zirkulierendem BNP), was ein Hinweis auf modulierende Langzeiteffekte von (B)NP auf die adrenergen Signalwege sein könnte (vgl. 3.3.1). Wie in der Arbeit von Perera et al. (2015) dargelegt, könnte auch hier eine Veränderung der Interaktion zwischen dem cAMP/PKA- und dem cGMP/PKG-Signalweg durch die PDEs eine Rolle spielen: Die PDE3 baut bis zu 50 % des intrazellulären cAMPs ab, kann jedoch durch cGMP inhibiert werden; es handelt sich bei der PDE3 um eine cGMP inhibierte cAMP PDE (Zaccolo und Movsesian, 2007). Eine konstant erhöhte Konzentration von zirkulierendem (B)NP und damit eine Erhöhung des intrazellulären cGMPs könnten so den Abbau von cAMP längerfristig reduzieren und somit den intrazellulären Signalweg der β -AR (über cAMP und PKA) stärken, was zu einer Steigerung der relativen

Kraftzunahme nach adrenerger Stimulation führen könnte (Primessnig & Deißler et al., 2022). Um diese Effekte im Detail nachzuweisen, sind jedoch weitere molekularbiologische Untersuchungen nötig.

Im Rahmen der PARADIGM-HF-Studie zeigte sich, dass die Behandlung mit einem ARNI neben einer langfristigen Erhöhung der Konzentration von zirkulierendem BNP (gemessen acht Monate nach Behandlungsbeginn) auch mit einer Erhöhung der cGMP-Urinkonzentration assoziiert ist (Packer et al., 2015). Der in der vorliegenden Arbeit in-vitro gezeigte Zusammenhang zwischen langfristig erhöhten (B)NP-Spiegeln (entsprechend des Plasma NT-proBNP) und einer Zunahme der β -adrenergen inotropen Reserve könnte zu einem gewissen Teil die klinisch beobachteten ARNI-Effekte erklären: Diese bewirken neben einer verminderten Mortalität (McMurray et al., 2014) und Morbidität (Packer et al., 2015) auch eine Verbesserung der echokardiographisch bestimmten LVEF (de Diego et al., 2018; Mantegazza et al., 2021). Neben dem aus einer ARNI-Therapie resultierenden *Reverse-Remodeling* mit Erholung der systolischen und diastolischen myokardialen Funktion (Martens et al., 2018) könnte also auch ein positiver langfristiger, direkter NP-Mechanismus auf die funktionelle Reserve zu einer verbesserten LVEF beitragen. Um diesen Zusammenhang nachzuweisen, sind jedoch insbesondere auch wegen der widersprüchlichen Daten bezüglich des NP-Effekts auf die atriale Inotropie und funktionelle Reserve weitere translationale Studien notwendig.

4.3 Diastolische Spannung und BNP bzw. LQB657 \pm Valsartan

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ebenfalls ein Fokus auf die Analyse der diastolischen Spannung (als Parameter der Lusitropie neben HRT und tau) und des Effekts einer Therapie mit BNP oder LBQ657 \pm Valsartan gelegt (siehe 3.3.2, 3.4.2, 3.5.2 und 3.6.2). Ein Anstieg der diastolischen Spannung wird unter anderem durch eine Erhöhung der diastolischen intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bedingt. Grundlage dieses Anstiegs der diastolischen Spannung bei erhöhten diastolischen Ca^{2+} -Konzentrationen ist die eingeschränkte Dissoziation der Aktin- und Myosinfilamente (Eisner et al., 2020).

Auch ein Anstieg der Stimulationsfrequenz bzw. Herzfrequenz führt zu einem Anstieg der diastolischen Ca^{2+} -Konzentration und somit zu einem Anstieg der diastolischen Spannung (Eisner et al., 2020; J K Gwathmey et al., 1991). Dies beruht im

4 Diskussion

Wesentlichen auf zwei Mechanismen: Einerseits auf dem frequenzabhängigen Anstieg des intrazellulären Na^+ -Gehalts, was über eine Reduktion der vorwärts arbeitenden NCX-Aktivität eine Erhöhung des diastolischen Ca^{2+} -Gehalts bewirkt. Andererseits auf einem erhöhten Ca^{2+} -Einstrom pro Zeiteinheit und einer gleichzeitig verkürzten Diastole, in welcher normalerweise das intrazelluläre Ca^{2+} eliminiert werden kann (Eisner et al., 2020; Pieske et al., 2002).

Neben den zuvor genannten Prozessen beeinflusst auch die Myofilament-Sensitivität die diastolische Spannung: So führt eine Reduktion der Myofilament Ca^{2+} -Sensitivität durch β -adrenerge Aktivierung der PKA mit folgender Phosphorylierung von Serin-23/24 des Troponin I zu einer Verminderung der diastolischen Spannung (Chung et al., 2016).

Zudem können Titin-abhängige Prozesse eine Rolle in der Ausprägung der diastolischen Spannung spielen: Während eine verminderte Titin-Phosphorylierung zu einer Erhöhung der diastolischen Spannung führen kann (Leite-Moreira et al., 2018; van Heerebeek et al., 2006), kann eine Reduktion der diastolischen Spannung durch eine Zunahme der Titin-Phosphorylierung (vermittelt durch PKA (Yamasaki et al., 2002) oder PKG (Krüger et al., 2009; Leite-Moreira et al., 2018; van Heerebeek et al., 2006)) bedingt sein.

Eine verringerte diastolische Spannung trägt zu einer insgesamt verbesserten diastolischen Funktion des Herzen bei, da sie in Teilen äquivalent zu einem verminderten Steifegrad des Myokards ist, woraus geringere Füllungsdrücke, ein reduzierter enddiastolischer Druck und somit insgesamt eine verbesserte diastolische Funktion und Füllung der Atrien und Ventrikel resultieren (Krüger et al., 2009). Eine Übersicht der zuvor diskutierten Einflussfaktoren ist in Abbildung 4-2 dargestellt.

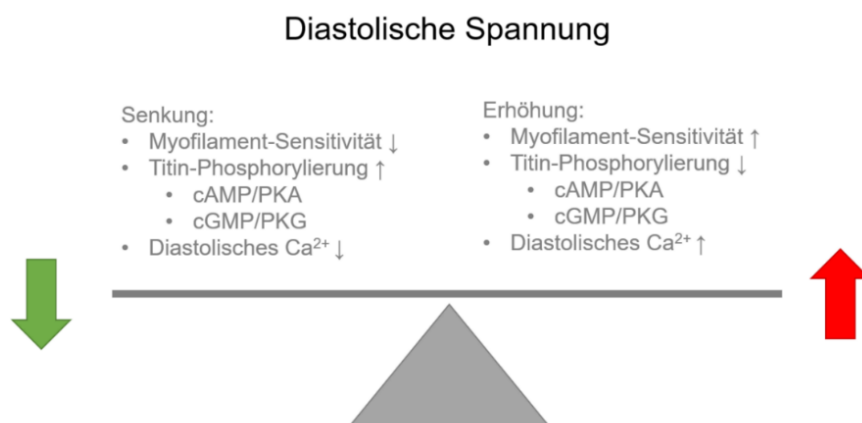


Abbildung 4-2: Übersicht über relevante Einfluss-faktoren auf die diastolische Spannung

4 Diskussion

Die diastolische Spannung fällt physiologisch nach Erreichen der maximalen Vordehnung ohne weitere Intervention langsam und stetig für >60 Minuten ab (Leite-Moreira et al., 2018). Der beobachtete Anstieg der diastolischen Spannung in den nur mit ISO behandelten Muskelstreifen ist somit als unphysiologisch und basierend auf den oben genannten Faktoren als dysfunktional einzuordnen. Es ist anzunehmen, dass dieser Anstieg zu großen Teilen auf einer Ca^{2+} -Überladung der Kardiomyozyten durch die Behandlung mit ISO basierte (Bers, 2002; Ellison et al., 2007; Mann et al., 1992); diese Überladung ist unter anderem durch ein diastolisches Ca^{2+} -Leck des RyR2 aus dem SR zu erklären, welches durch die Behandlung mit ISO ausgelöst werden kann (Dobrev und Wehrens, 2014). Diese Ca^{2+} -Überladung konnte augenscheinlich in den untersuchten Muskelstreifen durch die ebenfalls von ISO vermittelte verminderte Myofilament-Sensitivität und erhöhte Titin-Phosphorylierung nicht ausreichend kompensiert werden. Folglich kam es zu einem Anstieg der diastolischen Spannung (siehe Abb. 4-3).

Interessanterweise konnte in der vorliegenden Arbeit eine Verminderung der diastolischen Spannung in Muskelstreifen festgestellt werden, welche zusätzlich zu ISO mit 100 nM BNP behandelt wurden (vgl. 3.3.2 und 3.4.2). Diese im Vergleich zur nur mit ISO behandelten Kontrollgruppe signifikante Verminderung der diastolischen Spannung fand sich sowohl bei variierender Stimulationsfrequenz als auch bei konstanter Stimulationsfrequenz über einen längeren Zeitraum.

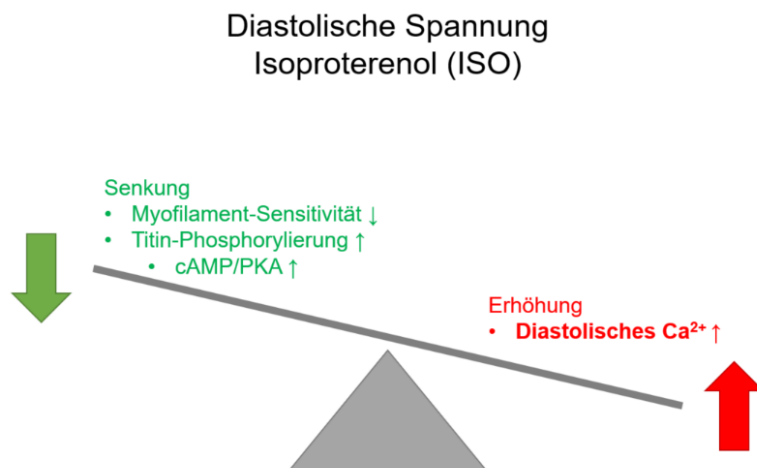


Abbildung 4-3: Verschobenes Gleichgewicht der Einflussfaktoren auf die diastolische Spannung nach Behandlung mit ISO

Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Untersuchung wurde eine supramaximale Dosis von BNP (100 nM) verwendet, um die maximale physiologisch

4 Diskussion

mögliche Aktivierung des NP-Signalwegs über den NPR-A und die folgende Signalkaskade über cGMP/PKG abzubilden (durchschnittliche Plasma BNP-Konzentration bei terminaler Herzinsuffizienz in-vivo: 0,074 nM (Goetze et al., 2020)). Zwei potenzielle Mechanismen scheinen zentral zu sein, um den gezeigten positiven Effekt von BNP auf die diastolische Spannung zu erklären:

In einer Arbeit von Leite-Moreira et al. aus dem Jahr 2018 beschrieben die Autor:innen einen neuen Mechanismus der Anpassung der diastolischen Spannung an eine plötzliche Dehnung des Myokards, die „*stretch-induced compliance*“. In der Untersuchung dieses Mechanismus zeigten sie, dass der cGMP/PKG-Signalweg eine zentrale Rolle in der Senkung der diastolischen Spannung nach akuter Vordehnung des Muskels spielt und dass unter anderem die cGMP/PKG-abhängige Titin-Phosphorylierung ein zentrales Element dieser Senkung der diastolischen Spannung darstellt. Auch die Analyse des Abfalls der diastolischen Spannung nach akuter Dehnung in rechtsventrikulären Papillarmuskeln von Kaninchen zeigte, dass eine kombinierte Inhibition des NO- und des NP-Signalwegs oder eine Inhibition der PKG jeweils einen verminderten Abfall der diastolischen Spannung im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe bewirkt, was die Rolle des cGMP/PKG-Signalswegs unterstreicht (Leite-Moreira et al., 2018). Die Ergebnisse eben dieser Arbeit deuten also darauf hin, dass der Effekt von BNP auf die diastolische Spannung zumindest in Teilen auf eine verstärkte Titin-Phosphorylierung mittels des cGMP/PKA-Signalwegs zurückzuführen ist (Krüger et al., 2009; Leite-Moreira et al., 2018; Yamasaki et al., 2002). Es ist zudem anzunehmen, dass die BNP-Effekte auf die diastolische Spannung insbesondere durch die Vorbehandlung mit ISO so deutlich nachgewiesen werden konnten (siehe 3.3.2 und 3.4.2): Während in der Studie von Leite-Moreira et al. der Effekt der jeweiligen Signalwege auf die diastolische Spannung mit der physiologischen Anpassung der diastolischen Spannung verglichen wurde, wurde in der vorliegenden Studie durch die zusätzliche ISO-Behandlung eine Kontrolle mit pathologischem Verlauf der diastolischen Spannung gewählt. Der positive Effekt von BNP auf die diastolische Spannung konnte somit besser aufgelöst werden. Insgesamt trägt die zusätzliche Gabe von BNP zu einer Modifikation des unphysiologischen Verlaufs/Anstiegs der diastolischen Spannung unter ISO-Behandlung bei, was zu einer physiologischeren Anpassung der diastolischen Spannung über die Zeit führt.

4 Diskussion

Ein möglicher zweiter zentraler Mechanismus des Effekts von BNP auf die diastolische Spannung ist zudem der direkte Effekt von BNP auf den zellulären Ca^{2+} -Stoffwechsel. In einer 2016 veröffentlichten Studie von Murakami et al. konnte in linksventrikulären Kardiomyozyten eines Herzinsuffizienz-Hundemodells gezeigt werden, dass ANP zu einer signifikanten Verminderung der ISO-induzierten diastolischen Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR (sog. Ca^{2+} -Sparks) führt. Dies geschah, ohne dass ANP eine Verminderung des Ca^{2+} -Gehalts des SRs bewirkte. Zudem führte eine Behandlung mit ANP zu einer Reduktion der mitochondrialen reaktiven Sauerstoff-Spezies-Entstehung (ROS-Entstehung). Diese Verminderung der ROS-Konzentration trägt ggf. ebenfalls zu einer Verminderung des diastolischen Ca^{2+} -Lecks bei (Murakami et al., 2016). Da ANP und BNP dieselben Rezeptoren binden, ist ein analoger hemmender Effekt von BNP auf die diastolische Ca^{2+} -Freisetzung und die ROS-Entstehung wahrscheinlich, was ebenfalls zu einer relativen Senkung der diastolischen Spannung beitragen könnte. Eine Zusammenfassung der potenziellen Effekte der BNP-Behandlung auf die diastolische Spannung ist in Abbildung 4-4 dargestellt.

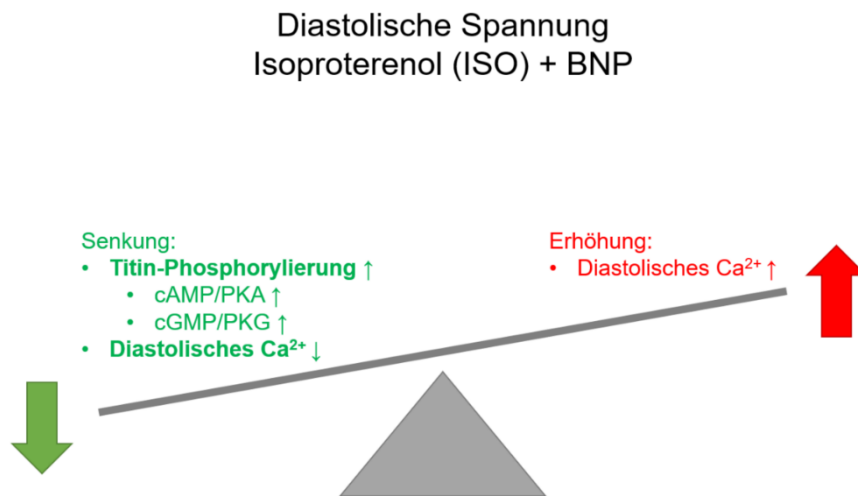


Abbildung 4-4: Einflussfaktoren der Wiederherstellung einer physiologischen Anpassung der diastolischen Spannung durch zusätzliche Behandlung mit BNP

In den mit LBQ657 \pm Valsartan behandelten Muskelstreifen konnte hingegen kein Effekt auf die diastolische Spannung nachgewiesen werden (siehe 3.5.2 und 3.6.2). Möglicherweise ist die begrenzte Menge des im kurzen untersuchten Zeitraum (maximale Behandlungsdauer mit LBQ657 \pm Valsartan 2.5-3 h, inklusive der Präinkubation) zusätzlich rekrutierten ANP und BNP nicht ausreichend, um einen

4 Diskussion

Effekt auf die diastolische Spannung zu bewirken. Auch eine Verdünnung der freigesetzten NPs im Organbad der Messstation kommt als Erklärung in Frage. Da jedoch klinisch ein genereller Effekt von Sacubitril/Valsartan auf den cGMP/PKG Signalweg in Patient:innen gezeigt werden konnte (Packer et al., 2015) und BNP in der vorliegenden Arbeit eine Reduktion der diastolischen Spannung bewirkte, ist ein Effekt der Behandlung mit LBQ657 ± Valsartan auf die diastolische Spannung unter Einbeziehung weiterer intrazellulärer und systemischer Signalkaskaden bei länger andauernder Behandlung anzunehmen. Dies sollte in zukünftigen funktionellen Studien untersucht werden.

4.4 Antiarrhythmische Wirkung von BNP und LBQ657 + Valsartan

In der PARADIGM-HF-Studie aus dem Jahr 2014 zeigte sich bei den eingeschlossenen Herzinsuffizienz-Patient:innen neben den bekannten ARNI-Effekten auf Mortalität und Hospitalisierung auch ein Trend hin zu einem geringeren Auftreten von ventrikulären Arrhythmien in der mit dem ARNI behandelten Gruppe. In dieser kam es bei 2,57 % der Patient:innen zum Auftreten einer ventrikulären Tachykardie (VT), während in der Kontrollgruppe mit Enalapril-Therapie 3,24 % der Patient:innen eine VT entwickelten. Dies entsprach einer OR für die ARNI-Therapie von 0,79 (0,61-1,02) bei einem $p=0,07$ (McMurray et al., 2014). In einer 2020 erschienenen Subgruppen-Analyse der PARADIGM-HF konnte diese Trend statistisch signifikant bestätigt werden: Das Auftreten eines plötzlichen Herztodes (SCD) wurde durch die Behandlung mit Sacubitril/Valsartan bei Patient:innen mit ICD um 51 % ($HR=0,49$ (0,25-0,99); $p=0,047$) gesenkt. Auch Patient:innen ohne ICD wiesen ein deutlich verringertes Auftreten eines SCD von 17 % ($HR=0,83$ (0,70-0,99); $p=0,03$) auf (Rohde et al., 2020).

Basierend auf dieser Erkenntnis verschob sich in den vergangenen Jahren der Fokus der Forschung zu ARNIs vermehrt auch auf den Bereich der Herzinsuffizienz-assoziierten Herzrhythmusstörungen (Primessnig & Deißler et al., 2022).

2018 veröffentlichten De Diego et al. eine der ersten klinischen Studien, welche dezidiert der Untersuchung des Einflusses einer ARNI-Behandlung auf kardiale

4 Diskussion

Arrhythmien gewidmet war. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Auftreten von nicht-anhaltenden und anhaltenden VTs durch eine Behandlung mit einem ARNI signifikant reduziert werden konnte. Auch das Auftreten von ventrikulären Extrasystolen (*PVC*) wurde stark reduziert; zudem konnte ein positiver Zusammenhang zwischen dem Plasma pro-BNP-Level der Patient:innen und der Anzahl an *PVCs* gezeigt werden. Neben diesen deutlichen Effekten auf die ventrikuläre Arrhythmogenese konnte jedoch nur ein statistischer Trend ($p=0,07$) zu einer Verminderung von atrialen Arrhythmien in dem Patient:innen-Kollektiv gezeigt werden (de Diego et al., 2018, Primessnig & Deißler et al., 2022). Die Erkenntnisse von De Diego et al. in Bezug auf das verminderte Auftreten ventrikulärer Arrhythmien aus einem neunmonatigen Nachverfolgungszeitraum konnten durch eine Studie mit einem Ein-Jahres-Follow-Up bestätigt werden (Martens et al., 2019).

Neben diesen klaren Hinweisen auf einen therapeutischen Effekt von ARNIs auf ventrikuläre Arrhythmien konnten De Vecchis et al. in ihrer 2020 veröffentlichten Arbeit zeigen, dass eine Sacubitril/Valsartan-Therapie auch mit einem verbesserten LA Strain und gleichzeitig einer signifikanten Verminderung des Risikos des Wiederauftretens von VHF assoziiert ist. Untersucht wurde dies in einem Kollektiv von Patient:innen mit mindestens einer bekannten VHF-Episode (De Vecchis et al., 2020). Erste Ergebnisse der SAVE THE RHYTHM Studie bestätigten die positiven Effekte von Sacubitril/Valsartan auch auf atriale Arrhythmien. In dieser präliminären Untersuchung zeigte sich, dass Sacubitril/Valsartan die Anzahl an anhaltenden atrialen Tachykardie-Episoden und VHF-Episoden in Patient:innen mit einem nicht-permanentem VHF und Patient:innen ohne vorbestehendes VHF signifikant reduziert (Guerra et al., 2020). Ein klinisch relevanter Effekt von Sacubitril/Valsartan auf atriale Arrhythmien ist folglich ebenfalls anzunehmen.

Sowohl der von De Diego et al. also auch der von De Vecchis et al. beschriebene Effekt auf Arrhythmien ist jeweils mit einer Verbesserung der kardialen Funktionsparameter assoziiert. In der Studie zu ventrikulären Rhythmusstörungen war das verminderte Auftreten von Arrhythmien mit einer Zunahme der EF und einer Abnahme des enddiastolischen Diameters des LV verbunden (de Diego et al., 2018). In der Studie zu atrialen Arrhythmien war die verminderte Wahrscheinlichkeit eines Wiederauftretens des VHF mit einem besseren LA Strain assoziiert (De Vecchis et al., 2020). Da eine zunehmende myokardiale Dehnung und das Auftreten von atrialen und

4 Diskussion

ventrikulären Arrhythmien miteinander korrelieren (Bode et al., 2001; Wang et al., 1994), könnten die zuvor beschriebenen klinischen antiarrhythmischen Effekte mit einem verminderten myokardialen Wandstress nach Sacubitril/Valsartan begründet werden.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich zwar eine Verminderung der diastolischen Spannung in den zusätzlich mit BNP behandelten Muskelstreifen, welche ebenfalls ein vermindertes Auftreten von Arrhythmien aufwies. Eine Behandlung mit LBQ657 + Valsartan führte jedoch zu keiner Reduktion der diastolischen Spannung im untersuchten Zeitraum, während ein antiarrhythmischer Effekt weiterhin nachweisbar war (vgl. 3.3.3, 3.4.3 und 3.6.3). Somit ist anzunehmen, dass die Reduktion der Wandspannung der Kammern zwar einen Teil der Wirkung von Sacubitril/Valsartan in vivo erklären kann, dass jedoch zusätzliche direkte Effekte ebenfalls wahrscheinlich sind (Primessnig & Deißler et al., 2022).

Diese Hypothese wird von einer experimentellen Studie von Eiringhaus et al. aus dem Jahr 2020 unterstützt: Die Autor:innen konnten in isolierten ventrikulären Kardiomyozyten von Wildtyp-Mäusen und von Patient:innen mit terminaler Herzinsuffizienz zeigen, dass eine Behandlung mit LBQ657 ± Valsartan nach ISO-Gabe zu einer Verminderung der proarrhythmischen Ca^{2+} -Spark-Frequenz und zu einer Verminderung des Ca^{2+} -Lecks aus dem SR führt. Eine alleinige Behandlung mit Valsartan konnte diesen Effekt nicht erzielen. Die Amplitude, Breite und Dauer der Ca^{2+} -Sparks in humanen ventrikulären Kardiomyozyten wurde ebenfalls durch eine Behandlung mit LBQ657 signifikant vermindert, ohne dass ein zusätzlicher Effekt von Valsartan gezeigt werden konnte (Eiringhaus et al., 2020).

Die Messungen der vorliegenden Arbeit bestätigten diesen antiarrhythmischen Effekt in einer Untersuchung atrialer Präparationen unter ähnlichen pharmakologischen Bedingungen. Die Vorbehandlung mit 30 nM ISO in der Studie von Eiringhaus ähnelte der in dieser Arbeit verwendeten Dosis von 20 nM. Interessanterweise konnte die vorliegende Arbeit (siehe 3.6.3) den antiarrhythmischen Effekt jedoch bereits bei einer geringeren Dosis von LBQ657 als Eiringhaus et al. zeigen ($\approx 22 \mu\text{M}$ vs. $40 \mu\text{M}$) (Primessnig & Deißler et al., 2022), welche der maximalen Plasmakonzentration von Sacubitrilat bei einem normalen Therapieregimen entspricht (Akahori et al., 2017; Gu et al., 2010).

4 Diskussion

Da sowohl eine Behandlung mit LBQ657 ± Valsartan als auch eine Behandlung mit ANP zu einer Verminderung der proarrhythmischen Ca²⁺-Spark-Frequenz und zu einer Verminderung des Ca²⁺-Lecks aus dem SR führen (Eiringhaus et al., 2020; Murakami et al., 2016), ist eine direkte antiarrhythmische Wirkung von LBQ657 über die Erhöhung der parakrinen Konzentration von ANP und BNP mit nachfolgender Suppression der Ca²⁺-Spark-Frequenz und des Ca²⁺-Lecks aus dem SR anzunehmen (Primessnig & Deißler et al., 2022). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten die gemeinsamen antiarrhythmischen Effekte von BNP und LBQ657 + Valsartan zum ersten Mal im selben Modell und unterstützten somit die Hypothese einer direkten NP-vermittelten antiarrhythmischen Wirkung von ARNIs auf supraventrikuläre Arrhythmien. Neben diesen direkten, kurzfristigen Effekten einer ARNI-Therapie auf die Arrhythmogenese sind zudem auch langfristige antiarrhythmische Effekte wie eine Hemmung der myokardialen Hypertrophie und eine Reduktion der Ca²⁺/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII) Phosphorylierung anzunehmen (Sutanto et al., 2021), welche jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht wurden.

4.5 VASP Phosphorylierung

VASP ist ein Substrat cAMP- und cGMP-abhängiger Kinasen. Durch eine Behandlung mit ISO erfolgt eine rapide Phosphorylierung an VASP-Serin-157 und Serin-239. Eine Behandlung mit ANP bewirkt hingegen lediglich eine Phosphorylierung an VASP-Serin-239 (Borgognone et al., 2014; Sartoretto et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde die VASP-Phosphorylierung an den Aminosäuren Serin-157 und Serin-239 untersucht, um eine eventuell gesteigerte Aktivität des cGMP/PKG Signalwegs nach Behandlung mit LBQ657 + Valsartan nachzuweisen. Unter ISO zeigte sich im Vergleich zu einer alleinigen Behandlung mit dem Vehikel DMSO jedoch kein Effekt von LBQ657 + Valsartan in den Muskelstreifen von N=5 Patient:innen (siehe Abb. 3-26, 3.7.1). In der Positivkontrolle (5-minütige Inkubation einer Gewebsprobe mit 200 nM ISO) konnte hingegen eine relativ zu den beiden Gruppen deutlich erhöhte Phosphorylierung nachgewiesen werden.

In der zuvor zitierten Studie von Sartoretto et al. (2009) wurde nach Behandlung mit 1 µM ANP ein Anstieg der relativen Serin-239 Phosphorylierung gezeigt, welcher jedoch

4 Diskussion

bereits 60 Minuten nach Beginn der Behandlung nicht mehr signifikant nachweisbar war. Auch eine Behandlung mit 100 nM ISO zeigte einen transienten Anstieg der relativen VASP-Serin-157- und Serin-239-Phosphorylierung, welcher ebenfalls 60 Minuten nach Beginn der Behandlung nicht mehr signifikant war (Sartoretto et al., 2009). Dies ist vereinbar mit den Befunden der in dieser Arbeit durchgeführten Messungen: Da die Behandlung der Muskelstreifen mit LBQ657 + Valsartan bereits etwa 150-180 Minuten vor Ende des Messprotokolls begann, war eine potenzielle Wirkung von ANP oder BNP in den Gewebeproben mittels VASP-Phosphorylierung nicht mehr sicher nachweisbar. Zudem ist eine Gewebskonzentration von 1 μ M ANP, wie sie in der Studie von Sartoretto et al. verwendet wurde, durch eine ARNI-Behandlung nicht zu erreichen, was gleichsam das Zeitfenster und die Möglichkeit für den Nachweis des LBQ657 + Valsartan-Effekts auf die VASP-Phosphorylierung weiter begrenzt.

Die 35 Minuten vor Ende des Messprotokolls durchgeführte Zugabe von ISO bewirkte hingegen eine Zunahme der Phosphorylierung an Serin-157 und Serin-239, welche folglich gleichermaßen in beiden Gruppen nachweisbar war (siehe 3.7.1). Da bereits in klinischen Studien gezeigt werden konnte, dass eine Behandlung mit Sacubitril/Valsartan mit einer Erhöhung des cGMP/PKG Signalwegs assoziiert ist (Packer et al., 2015), ist diese Wirkung trotz der Ergebnisse dieses Experiments weiterhin anzunehmen. Zukünftige Studien sollten aufgrund der zeitlich begrenzten Auflösung der VASP-Phosphorylierung auf andere Marker des cGMP/PKG-Signalwegs wie etwa den direkten Nachweis der zellulären cGMP-Konzentration zurückgreifen, welche einen robusteren und zeitlich stabileren Nachweis ermöglichen (Leite-Moreira et al., 2018).

4.6 Neprilysin Expression

Obwohl im Rahmen der klinischen Nutzung von NEP-Inhibitoren die generelle Rolle einer Inhibition der Endopeptidase NEP intensiv untersucht wird (Hubers und Brown, 2016), besteht noch immer Unklarheit über die Veränderung der kardialen NEP-Expression im Rahmen einer Herzinsuffizienz.

Fielitz et al. zeigten in einer Studie aus dem Jahr 2002, dass die NEP mRNA- und NEP-Aktivität im LV von Patient:innen mit Aortenklappenstenose und dilatativer Kardiomyopathie signifikant im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (nicht-verwendete Spenderherzen ohne kardiale Vorerkrankungen) erhöht war. Die Autor:innen stellten basierend auf dieser Erkenntnis die Hypothese auf, dass eine Erhöhung der kardialen NEP-Aktivität durch eine Zunahme des lokalen Abbaus von NPs und Bradykinin zu einer Verstärkung der Gewebshypertrophie und -fibrose führe (Fielitz et al., 2002, Primessnig & Deißler et al., 2022). Im Gegensatz dazu zeigte eine Arbeit aus dem Jahr 2020 eine systemische Herunterregulation von NEP in einem Schweine-Modell mit ischämischer Kardiomyopathie und HFrEF. Sowohl die Gewebskonzentration von NEP als auch die enzymatische NEP-Aktivität waren in einer gepoolten Analyse aller Organe im HFrEF Tiermodell gegenüber den Kontrolltieren deutlich vermindert. Es konnten jedoch keine signifikante, sondern nur eine numerische Verminderung der NEP Expression im Herzen des HFrEF-Tiermodells gezeigt werden (Pavo et al., 2020, Primessnig & Deißler et al., 2022).

Die vorliegende Studie knüpft an diese Erkenntnisse an und bestätigt eine Verminderung der NEP-Expression mit zunehmender kardialer Dysfunktion im LV und RA eines Patient:innen-Kollektivs mit terminaler Herzinsuffizienz (siehe 3.7.2). Der in der vorliegenden Arbeit dargelegte Zusammenhang zwischen LA Volumen und LV NEP-Expression ($r=-0,691$; $p=0,039$) und RA EF und RA NEP-Expression ($r=0,806$, $p=0,016$) deutet zudem an, dass eine zunehmende kardiale Druckbelastung und Dysfunktion ein Trigger für die Herabregulierung der NEP-Expression sein könnten (Primessnig & Deißler et al., 2022).

Die Hypothese, dass eine zunehmende kardiale Druckbelastung (in diesem Fall durch das zunehmende LA-Volumen angedeutet) reaktiv zu einer kompensatorischen Herunterregulation von NEP führe, wird durch mehrere Beobachtungen gestützt. Ando

4 Diskussion

et al. zeigten in einer Patient:innen-Studie, dass eine Behandlung mit dem NEP-Inhibitor Candoxatril zu einer Senkung des zentralvenösen Drucks und somit zu einer Verminderung der kardialen Vorlast führt. Interessanterweise führt diese Inhibition jedoch auch zu einem Anstieg des systolischen Blutdrucks (Ando et al., 1995, Primessnig & Deißler et al., 2022). Eine weitere Studie von Elsner et al. konnte ebenfalls eine Verminderung der LV und RV-Vorlast durch die NEP-Inhibition mittels Candoxatril zeigen (Elsner et al., 1992).

Eine adaptive NEP-Herunterregulation mit dem Ziel einer kompensatorischen Verminderung der gesteigerten Vorlast, beispielsweise vermittelt durch eine erhöhte Wandbelastung der Kammern, wäre also vorstellbar. Die gleichzeitig steigenden systolischen Blutdrücke im Rahmen einer isolierten NEP-Inhibition deuten jedoch darauf hin, dass eine solche kompensatorische Herabregulation von NEP einen zumindest partiell maladaptiven Charakter haben könnte (Primessnig & Deißler et al., 2022). Dieser maladaptive Charakter ist auf den bei NEP-Herabregulation ebenfalls verminderten Abbau von AT₂ und ET-1 zurückzuführen (Ando et al., 1995; Richards et al., 1992). Eine erhöhte Konzentration von AT₂ und ET-1 neutralisiert mit ihren in dieser Konstellation gegensätzlichen Effekten die positive Wirkung der erhöhten Konzentration von NPs (Castro-Chaves et al., 2009; Davenport et al., 2016; von Lewinski et al., 2008). Der beschriebene Mechanismus einer zunehmenden NEP-Herabregulation mit fortschreitender Herzinsuffizienz wäre also, wie auch andere kompensatorische Mechanismen im Rahmen einer Herzinsuffizienz wie der myokardialen Hypertrophie (Ritter und Neyses, 2003) oder der RAAS-Aktivierung (Hartupee und Mann, 2018), zumindest partiell maladaptiv (Primessnig & Deißler et al., 2022).

Die bei einer isolierten Behandlung mit einem NEP-Inhibitor ansteigenden Spiegel von AT₂ und ET-1 könnten zudem auch erklären, warum die alleinige Behandlung mit LBQ657 keinen Effekt auf die Arrhythmogenese und funktionellen Parameter der Muskelstreifen zeigte. Aufgrund der proarrhythmischen Wirkung von AT₂ (von Lewinski et al., 2008) kam es erst durch die zusätzliche Blockade des AT₁-Rezeptors durch Valsartan zu einem Überwiegen der positiven Effekte der NEP-Inhibition mit gesteigerter NP-Bioverfügbarkeit (Primessnig & Deißler et al., 2022), wie in der vorliegenden Arbeit durch den antiarrhythmischen Effekt in-vitro dargestellt wurde (vgl. 3.6.3) und in klinischen Studien gezeigt werden konnte (Hubers und Brown, 2016).

4.7 Limitationen

Die vorliegende Arbeit untersuchte in einem humanen in-vitro Modell Parameter der atrialen Kontraktilität und Arrhythmien. Eine Limitation der Arbeit stellt die generell begrenzte Verfügbarkeit humaner atrialer Proben dar, aufgrund derer mit relativ geringen Patient:innen- und Muskelstreifenzahlen gearbeitet werden musste (Primessnig & Deißler et al., 2022). Aus epidemiologischen Gründen handelte es sich zudem um ein eher älteres (Durchschnittsalter 71 Jahre) und männliches (86% männliche Patienten) Kollektiv. Zudem ist auch die Heterogenität des untersuchten Patient:innen-Kollektivs in Bezug auf Vorerkrankungen und Begleitfaktoren zu erwähnen, welche in Studien an humanen Proben nicht zu vermeiden ist und welche zum Teil die hohe Variabilität der gemessenen Daten erklärt. Auf der anderen Seite spiegelt diese Heterogenität der Patient:innen die in der Klinik zu erwartende Variabilität wider (Primessnig & Deißler et al., 2022), wodurch eine Übertragbarkeit der gezeigten Effekte auf ein allgemeines Patient:innen-Kollektiv wahrscheinlicher wird. Da aufgrund von Messproblemen der Durchmesser einiger Muskelstreifen im zweiten Messprotokoll (Kapitel 3.4) nicht erhoben werden konnte, konnte die diastolische Spannung in Abb. 3-13 nicht auf die Querschnittsfläche des Muskels normalisiert werden. Die Ergebnisse spiegeln jedoch die aus dem ersten Protokoll (Kapitel 3.3) erwarteten Ergebnisse wider und zeigen ebenfalls einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen, welcher einen positiven Effekt von BNP auf die diastolische Spannung andeutet.

Zudem zeigt sich in den Messungen der vorliegenden Arbeit, dass die entwickelte Kraft besonders bei eher niedrigen Stimulationsfrequenzen maximal ist und mit zunehmender Stimulationsfrequenz abnimmt. Diese Verschiebung der maximalen Kraftentwicklung hin zu geringeren Stimulationsfrequenzen kann auf verschiedene Faktoren zurückgeführt werden: Generell wurden in dieser Arbeit Patient:innen mit schweren kardialen Vorerkrankungen eingeschlossen, welche einer offene Herzoperation bedurften. Bei etwa 30 % der Patient:innen war bereits eine Herzinsuffizienz vorbeschrieben; der tatsächliche Anteil von Patient:innen mit Herzinsuffizienz könnte jedoch in Anbetracht der hohen Anzahl an Patient:innen mit behandlungsbedürftiger KHK und einem medianen NT-proBNP von 769 pg/ml trotz insgesamt erhaltenen gemessenen Ejektionsfraktion (53 % im Median) noch höher

4 Diskussion

ausfallen. Für die Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion ist eine Abnahme der Kontraktionskraft mit zunehmender Stimulationsfrequenz beschrieben, wie sie auch in dieser Studie festgestellt wurde (Holubarsch et al., 1995; Mulieri et al., 1992; Schwinger et al., 1993). In in-vivo Studien in Patient:innen mit HFpEF zeigte sich ebenfalls eine Abnahme des Schlagvolumens mit zunehmender Herzfrequenz, was jedoch auf eine diastolische Dysfunktion und eine daraus resultierende Abnahme des enddiastolischen Volumens zurückgeführt wurde (Wachter et al., 2009; Yamanaka et al., 2006). Inwieweit dies auch in-vitro zu beobachten ist, ist in bisherigen Studien nicht ausreichend untersucht. Außerdem wurde in der vorliegenden Arbeit auf eine zusätzliche Begasung der Perfusionslösung mit Sauerstoff während der Versuche verzichtet, um hyperbare Sauerstoff-Konzentrationen zu vermeiden. Dies sollte Versuchsbedingungen näher am physiologischen Zustand bei einem pO_2 von etwa 150 mmHg (entsprechend der O_2 -Fraktion der Umgebungsluft von 21 % unter Normalbedingungen) in der Perfusionslösung schaffen; zur Pufferung wurde aus diesem Grund ein HEPES-basiertes System verwendet. In einigen Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass eine transiente Hypoxie zu einer Verschiebung des Kraft-Frequenz-Verhältnisses und zu einer Verminderung der entwickelten Kraft führen kann; eine hypoxische Komponente kann aus diesem Grund ebenfalls nicht abschließend ausgeschlossen werden (Hanouz et al., 2002; Iwashiro et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch gezeigt, dass mit dem verwendeten System stabile Messungen über einen längeren Zeitraum durchgeführt werden können. So kam es über einen Zeitraum von 60 Minuten nach Behandlung mit ISO lediglich zu einem durchschnittlichen Abfall der systolischen Kraft um 7 %, was den in der Literatur beschriebenen Werten entspricht und diese je nach Autor:in sogar unterbietet (Hanouz et al., 2002; Milani-Nejad et al., 2014; Primessnig, 2011). Die in Abbildung 3-2 gezeigten Vorversuche zeigten zudem, dass die entwickelte systolische Kraft auch nach Variation der Stimulationsfrequenz stabil war. Reproduzierbare Messungen im verwendeten Messsystem waren somit gewährleistet.

Als letzte Limitation muss die Verwendung von DMSO als Lösungsmittel diskutiert werden: DMSO wurde in der vorliegenden Arbeit für die pharmakologischen Untersuchungen von LBQ657 ± Valsartan als Lösungsmittel (entsprechend der Herstellerangaben) verwendet. Während ältere Studien eine Konzentration von <10 % DMSO als unbedenklich einstufen (Verheijen et al., 2019), stellten neuere Studien

4 Diskussion

diese Ergebnisse in Frage: Insbesondere eine lang-andauernde Inkubation mit DMSO zeigte bei aus induzierten pluripotenten Stammzellen generierten Kardiomyozyten und in retinalen Zellen epigenetische Modifikationen beziehungsweise proapoptotische Effekte bereits bei einer Konzentration von 0,1 % DMSO (Galvao et al., 2014; Verheijen et al., 2019). Diese Konzentration wurde in der vorliegenden Arbeit mit einer Konzentration von 0,4% deutlich überschritten. Da DMSO jedoch auch in den jeweiligen Kontrollgruppen verwendet wurde (Primessnig & Deißler et al., 2022) und eine Einwirkungszeit von maximal 3h vorlag, sind diese Effekte zu vernachlässigen.

5 Einordnung der Ergebnisse in den Gesamtkontext, Ausblick und Schlussfolgerung

Herzinsuffizienz und VHF sind Volkskrankheiten mit Millionen Betroffenen alleine in Europa. Etwa 1-2 % der europäischen Bevölkerung sind von einer Herzinsuffizienz betroffen (McDonagh et al., 2021), die Prävalenz des VHF liegt bei etwa 2 % in westlichen Ländern (Zoni-Berisso et al., 2014). Insbesondere das gemeinsame Auftreten beider Erkrankungen ist mit einer deutlich erhöhten Morbidität und Mortalität assoziiert (Wang et al., 2003). Trotz medikamentöser und interventioneller Fortschritte in der Therapie beider Erkrankungen ist eine adäquate Behandlung weiterhin eine Herausforderung.

In diesem Kontext demonstriert die vorliegende Arbeit erstmalig in-vitro einen Zusammenhang zwischen einer BNP- bzw. einer LBQ657/Valsartan-Behandlung und einer signifikanten Reduktion des Auftretens von Arrhythmien in humanen atrialen Myokardproben unter adrenergem Stress. Darüber hinaus konnte auch ein direkter Effekt von BNP auf die diastolische Spannung der Muskelpräparationen und ein potenzieller Mechanismus der NEP-Regulation in Patient:innen mit terminaler Herzinsuffizienz gezeigt werden. All diese Erkenntnisse leisten einen Beitrag zu einem verbesserten mechanistischen Verständnis der medikamentösen Behandlung mit Sacubitril/Valsartan bei Patient:innen mit Herzinsuffizienz und zeigen zudem potenzielle antiarrhythmische Effekte einer solchen Behandlung auf, welche insbesondere für Patient:innen mit VHF oder Vorhofremodelling von großer Relevanz sein können (Primessnig & Deißler et al., 2022). Aus den Ergebnissen der Arbeit kann geschlossen werden, dass insbesondere die Gruppe der Hochrisikopatient:innen mit gleichzeitig auftretender Herzinsuffizienz und VHF von einer frühzeitigen ARNI-Therapie profitieren können. Eine ARNI-Behandlung könnte über die klassisch bekannten ARNI-Effekte hinaus erhebliche positive Auswirkungen haben, indem sie die Induktion von Vorhofarrhythmien unterdrückt und somit die Vorhoffunktion aufrechterhält (siehe auch De Vecchis et al. 2020). Die in der vorliegenden Arbeit in-vitro gezeigte Korrelation zwischen langfristig erhöhten (B)NP-Spiegeln (entsprechend des Plasma NT-proBNP) und einer Zunahme der β -adrenergen inotropen Reserve könnte zudem auf einen langfristigen, direkten NP-Effekt auf die funktionelle Reserve

5 Einordnung und Ausblick

des Myokards hinweisen, welcher zu einer verbesserten LV-Funktion bei Herzinsuffizienz beitragen könnte.

Die durchgeführten Untersuchungen demonstrieren die Effekte einer Therapie mit LBQ657/Valsartan in multizellulären atrialen Präparaten, ohne jedoch durch eine ausführliche molekularbiologische Untersuchung oder zelluläre Studien die vermuteten Signalwege abschließend zu bestätigen. Zukünftige Arbeiten könnten beispielsweise durch histologische oder molekularbiologische Analysen die Gewebskonzentration von BNP und anderen Hormonen nach Behandlung mit LBQ657/Valsartan bestimmen und so einen Beitrag zu einem vertieften mechanistischen Verständnis leisten. Auch die Analyse der Phosphorylierung von Titin oder der PDE3, sowie der lokalen Expression von β -AR könnten gezeigte Effekte auf zellulärer Ebene einordnen. Schließlich könnte durch die mikroskopische Untersuchung isolierter humaner Kardiomyozyten mit einem Konfokal-Mikroskop der Effekt von BNP und LBQ657/Valsartan auf atrialer zellulärer Ebene bestätigt werden.

Die in der Arbeit gezeigten Ergebnisse sind insbesondere als Grundlage für weitere klinische Studien auf Vorhofebene relevant, da sie einen mechanistischen Einblick in die potenziellen antiarrhythmischen Effekte von Sacubitril/Valsartan auf das Auftreten von Vorhofflimmern in einem humanen Modell geben. Zukünftige Studien wie die aktuell laufende SAVE THE RHYTHM Studie könnten eine Translation der gezeigten Effekte in klinisch-therapeutische Handlungsempfehlungen ermöglichen. Die zudem gezeigten Effekte einer Herzinsuffizienz auf die kardiale Expression von NEP tragen zu einem verbesserten pathophysiologischen Verständnis der NEP-Expression bei, welches zukünftig bei der Entscheidung für eine gezielte Therapie mit NEP-Inhibitoren genutzt werden könnte.

6 Quellenverzeichnis

- Abhayaratna, W.P., Fatema, K., Barnes, M.E., Seward, J.B., Gersh, B.J., Bailey, K.R., Casaclang-verzosa, G., Tsang, T.S.M., 2008. Left Atrial Reservoir Function as a Potent Marker for First Atrial Fibrillation or Flutter in Persons > 65 Years of Age. *Am. J. Cardiol.* 101, 1626–1629.
- Agnoletti, G., Rodella, A., Cornacchiari, A., Panzali, A.F., Harris, P., Ferrari, R., 1992. Isoproterenol induces release of atrial natriuretic peptide from rat atrium in vitro. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 262, H285–H292.
- Ahlquist, R.P., 1973. Isoproterenol in cardiology. *Am. Heart J.* 86, 149–151.
- Akahori, M., Ayalasomayajula, S., Langenickel, T., Pal, P., Zhou, W., Sunkara, G., 2017. Pharmacokinetics After Single Ascending Dose, Food Effect, and Safety of Sacubitril/Valsartan (LCZ696), an Angiotensin Receptor and Neprilysin Inhibitor, in Healthy Japanese Subjects. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 42, 407–416.
- Altamish, M., Samuel, V.P., Dahiya, R., Singh, Y., Deb, P.K., Bakshi, H.A., Tambuwala, M.M., Chellappan, D.K., Collet, T., Dua, K., Gupta, G., 2020. Molecular signaling of G-protein-coupled receptor in chronic heart failure and associated complications. *Drug Dev. Res.* 81, 23–31.
- Ando, S.I., Rahman, M.A., Butler, G.C., Senn, B.L., Floras, J.S., 1995. Comparison of candoxatril and atrial natriuretic factor in healthy men: Effects on hemodynamics, sympathetic activity, heart rate variability, and endothelin. *Hypertension* 26, 1160–1166.
- Anker, S.D., Butler, J., Filippatos, G., Ferreira, J.P., Bocchi, E., Böhm, M., Brunner-La Rocca, H.-P., Choi, D.-J., Chopra, V., Chuquiure-Valenzuela, E., Giannetti, N., Gomez-Mesa, J.E., Janssens, S., Januzzi, J.L., Gonzalez-Juanatey, J.R., Merkely, B., Nicholls, S.J., Perrone, S. V, Piña, I.L., Ponikowski, P., Senni, M., Sim, D., Spinar, J., Squire, I., Taddei, S., Tsutsui, H., Verma, S., Vinereanu, D., Zhang, J., Carson, P., Lam, C.S.P., Marx, N., Zeller, C., Sattar, N., Jamal, W., Schnaidt, S., Schnee, J.M., Brueckmann, M., Pocock, S.J., Zannad, F., Packer, M., 2021. Empagliflozin in Heart Failure with a Preserved Ejection Fraction. *N. Engl. J. Med.* 385, 1451–1461.
- Anter, E., Jessup, M., Callans, D.J., 2009. Atrial fibrillation and heart failure: Treatment considerations for a dual epidemic. *Circulation* 119, 2516–2525.
- Anwar, A.M., Geleijnse, M.L., Soliman, O.I.I., Nemes, A., ten Cate, F.J., 2007. Left atrial Frank-Starling law assessed by real-time, three-dimensional echocardiographic left atrial volume changes. *Heart* 93, 1393–1397.
- Benjamin, E.J., Muntner, P., Alonso, A., Bittencourt, M.S., Callaway, C.W., Carson, A.P., Chamberlain, A.M., Chang, A.R., Cheng, S., Das, S.R., Delling, F.N., Djousse, L., Elkind, M.S. V, Ferguson, J.F., Fornage, M., Jordan, L.C., Khan, S.S., Kissela, B.M., Knutson, K.L., Kwan, T.W., Lackland, D.T., Lewis, T.T., Lichtman, J.H., Longenecker, C.T., Loop, M.S., Lutsey, P.L., Martin, S.S., Matsushita, K., Moran, A.E., Mussolino, M.E., O’Flaherty, M., Pandey, A., Perak, A.M., Rosamond, W.D., Roth, G.A., Sampson, U.K.A., Satou, G.M., Schroeder, E.B., Shah, S.H., Spartano, N.L., Stokes, A., Tirschwell, D.L., Tsao, C.W., Turakhia, M.P., VanWagner, L.B., Wilkins, J.T., Wong, S.S., Virani, S.S., 2019. Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 139, e56–e528.
- Bers, D.M., 2002. Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature* 415, 198–205.
- Bers, D.M., 2006. Altered cardiac myocyte Ca regulation in heart failure. *Physiology (Bethesda)*. 21, 380–387.

6 Quellenverzeichnis

- Bers, D.M., Perez-Reyes, E., 1999. Ca channels in cardiac myocytes: Structure and function in Ca influx and intracellular Ca release. *Cardiovasc. Res.* 42, 339–360.
- Blanton, R.M., 2020. cGMP Signaling and Modulation in Heart Failure, *Journal of cardiovascular pharmacology*.
- Blatter, L.A., Kanaporis, G., Martinez-Hernandez, E., Oropeza-Almazan, Y., Banach, K., 2021. Excitation-contraction coupling and calcium release in atrial muscle. *Pflugers Arch.* 473, 317–329.
- Bleumink, G.S., Knetsch, A.M., Sturkenboom, M.C.J.M., Straus, S.M.J.M., Hofman, A., Deckers, J.W., Witteman, J.C.M., Stricker, B.H.C., 2004. Quantifying the heart failure epidemic: Prevalence, incidence rate, lifetime risk and prognosis of heart failure - The Rotterdam Study. *Eur. Heart J.* 25, 1614–1619.
- Bode, F., Sachs, F., Franz, M.R., 2001. Tarantula peptide inhibits atrial fibrillation. *Nature* 409, 35–36.
- Bootman, M.D., Higazi, D.R., Coombes, S., Roderick, H.L., 2006. Calcium signalling during excitation-contraction coupling in mammalian atrial myocytes. *J. Cell Sci.* 119, 3915–3925.
- Borgognone, A., Lowe, K.L., Watson, S.P., Madhani, M., 2014. Natriuretic peptides induce weak VASP phosphorylation at Serine 239 in platelets. *Platelets* 25, 1–7.
- Bowditch, H.P., 1871. Ueber die Eigentümlichkeiten der Reizbarkeit, welche die Muskelfasern des Herzens zeigen. *Berichte des Math-Phys sächs Gesellsch d Wissensch, Leipzig, Ger.*
- Calderone, A., Thaik, C.M., Takahashi, N., Chang, D.L., Colucci, W.S., 1998. Nitric oxide, atrial natriuretic peptide, and cyclic GMP inhibit the growth-promoting effects of norepinephrine in cardiac myocytes and fibroblasts. *J. Clin. Invest.* 101, 812–818.
- Castro-Chaves, P., Fontes-Carvalho, R., Pintalhão, M., Pimentel-Nunes, P., Leite-Moreira, A.F., 2009. Angiotensin II-induced increase in myocardial distensibility and its modulation by the endocardial endothelium in the rabbit heart. *Exp. Physiol.* 94, 665–674.
- Chambers, D.J., Fallouh, H.B., 2010. Cardioplegia and cardiac surgery: Pharmacological arrest and cardioprotection during global ischemia and reperfusion. *Pharmacol. Ther.* 127, 41–52.
- Chen, H.H., Grantham, J.A., Schirger, J.A., Jougasaki, M., Redfield, M.M., Burnett, J.C., 2000. Subcutaneous administration of brain natriuretic peptide in experimental heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 36, 1706–1712.
- Chen, P.-S., Chen, L.S., Fishbein, M.C., Lin, S.-F., Nattel, S., 2014. Role of the Autonomic Nervous System in Atrial Fibrillation. *Circ. Res.* 114, 1500–1515.
- Cheng, Y., Regnier, M., 2016. Cardiac troponin structure-function and the influence of hypertrophic cardiomyopathy associated mutations on modulation of contractility. *Arch. Biochem. Biophys.* 601, 11–21.
- Choudhury, M., Boyett, M.R., Morris, G.M., 2015. Biology of the Sinus Node and its Disease. *Arrhythmia Electrophysiol. Rev.* 4, 28–34.
- Chung, J.H., Biesiadecki, B.J., Ziolo, M.T., Davis, J.P., Janssen, P.M.L., 2016. Myofilament calcium sensitivity: Role in regulation of in vivo cardiac contraction and relaxation. *Front. Physiol.* 7, 1–9.
- Dashwood, A., Cheesman, E., Wong, Y.W., Haqqani, H., Beard, N., Hay, K., Spratt, M., Chan, W., Molenaar, P., 2021. Effects of omecamtiv mecarbil on failing human ventricular trabeculae and interaction with (-)-noradrenaline. *Pharmacol. Res. Perspect.* 9, 1–11.
- Davenport, A.P., Hyndman, K.A., Dhaun, N., Southan, C., Kohan, D.E., Pollock, J.S.,

6 Quellenverzeichnis

- Pollock, D.M., Webb, D.J., Maguire, J.J., 2016. Endothelin. *Pharmacol. Rev.* 68, 357–418.
- de Bold, A.J., Borenstein, H.B., Veress, A.T., Sonnenberg, H., 1981. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci.* 28, 89–94.
- de Diego, C., González-Torres, L., Núñez, J.M., Centurión Inda, R., Martín-Langerwerf, D.A., Sangio, A.D., Chochowski, P., Casanovas, P., Blazquez, J.C., Almendral, J., 2018. Effects of angiotensin-neprilysin inhibition compared to angiotensin inhibition on ventricular arrhythmias in reduced ejection fraction patients under continuous remote monitoring of implantable defibrillator devices. *Hear. Rhythm* 15, 395–402.
- de Tombe, P.P., 2003. Cardiac myofilaments: mechanics and regulation. *J. Biomech.* 36, 721–730.
- De Vecchis, R., Paccone, A., Di Maio, M., 2020. Favorable Effects of Sacubitril/Valsartan on the Peak Atrial Longitudinal Strain in Patients With Chronic Heart Failure and a History of One or More Episodes of Atrial Fibrillation: A Retrospective Cohort Study. *J. Clin. Med. Res.* 12, 100–107.
- Deacon, C.F., 2019. Physiology and Pharmacology of DPP-4 in Glucose Homeostasis and the Treatment of Type 2 Diabetes. *Front. Endocrinol.*
- Dimitroula, H., Damvopoulou, E., Giannakoulas, G., Dalamanga, E., Dimitroulas, T., Sarafidis, P.A., Styliadis, H., Hatzitolios, A., Karvounis, H., Parcharidis, G., 2010. Effects of renin-angiotensin system inhibition on left atrial function of hypertensive patients: An echocardiographic tissue deformation imaging study. *Am. J. Hypertens.* 23, 556–561.
- Dobrev, D., Wehrens, X.H.T., 2014. Role of RyR2 Phosphorylation in Heart Failure and Arrhythmias. *Circ. Res.* 114, 1311–1319.
- Dukes, I.D., Vaughan Williams, E.M., 1984. Effects of selective alpha 1-, alpha 2-, beta 1- and beta 2-adrenoceptor stimulation on potentials and contractions in the rabbit heart. *J. Physiol.* 355, 523–546.
- Eiringhaus, J., Wünsche, C.M., Tirilomis, P., Herting, J., Bork, N., Nikolaev, V.O., Hasenfuss, G., Sossalla, S., Fischer, T.H., 2020. Sacubitrilat reduces pro-arrhythmogenic sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in human ventricular cardiomyocytes of patients with end-stage heart failure. *ESC Hear. Fail.* 7, 2992–3002.
- Eisner, D.A., Caldwell, J.L., Trafford, A.W., Hutchings, D.C., 2020. The Control of Diastolic Calcium in the Heart. *Circ. Res.* 126, 395–412.
- Ellison, G.M., Torella, D., Karakikes, I., Purushothaman, S., Curcio, A., Gasparri, C., Indolfi, C., Cable, N.T., Goldspink, D.F., Nadal-Ginard, B., 2007. Acute β_2 -Adrenergic Overload Produces Myocyte Damage through Calcium Leakage from the Ryanodine Receptor 2 but Sparing Cardiac Stem Cells *. *J. Biol. Chem.* 282, 11397–11409.
- Elsner, D., Müntze, A., Kromer, E.P., Riegger, G.A., 1992. Effectiveness of endopeptidase inhibition (candoxatril) in congestive heart failure. *Am. J. Cardiol.* 70, 494–8.
- Evenäs, J., Malmendal, A., Forsén, S., 1998. Calcium. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2, 293–302.
- Fabiato, A., 1983. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am. J. Physiol.* 245, C1-14.
- Fabiato, A., Fabiato, F., 1975. Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. *J.*

6 Quellenverzeichnis

- Physiol. 249, 469–495.
- Fabiato, A., Fabiato, F., 1979. Use of chlorotetracycline fluorescence to demonstrate Ca²⁺-induced release of Ca²⁺ from the sarcoplasmic reticulum of skinned cardiac cells. *Nature* 281, 146–148.
- Feng, L., Karpinski, P.H., Sutton, P., Liu, Y., Hook, D.F., Hu, B., Blacklock, T.J., Fanwick, P.E., Prashad, M., Godtfredsen, S., Ziltener, C., 2012. LCZ696: a dual-acting sodium supramolecular complex. *Tetrahedron Lett.* 53, 275–276.
- Fielitz, J., Dendorfer, A., Pregla, R., Ehler, E., Zurbrügg, H.R., Bartunek, J., Hetzer, R., Regitz-Zagrosek, V., 2002. Neutral endopeptidase is activated in cardiomyocytes in human aortic valve stenosis and heart failure. *Circulation* 105, 286–289.
- Forfia, P.R., Lee, M., Tunin, R.S., Mahmud, M., Champion, H.C., Kass, D.A., 2007. Acute Phosphodiesterase 5 Inhibition Mimics Hemodynamic Effects of B-Type Natriuretic Peptide and Potentiates B-Type Natriuretic Peptide Effects in Failing But Not Normal Canine Heart. *J. Am. Coll. Cardiol.* 49, 1079–1088.
- Fryer, M.W., Gage, P.W., Neering, I.R., Dulhunty, A.F., Lamb, G.D., 1988. Paralysis of skeletal muscle by butanedione monoxime, a chemical phosphatase. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 411, 76–79.
- Fu, S., Ping, P., Wang, F., Luo, L., 2018. Synthesis, secretion, function, metabolism and application of natriuretic peptides in heart failure. *J. Biol. Eng.* 12, 2.
- Galvao, J., Davis, B., Tilley, M., Normando, E., Duchon, M.R., Cordeiro, M.F., 2014. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *FASEB J.* 28, 1317–1330.
- Gambardella, J., Trimarco, B., Iaccarino, G., Santulli, G., 2018. New Insights in Cardiac Calcium Handling and Excitation-Contraction Coupling. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1067, 373–385.
- Gardner, D.G., Chen, S., Glenn, D.J., Grigsby, C.L., 2007. Molecular Biology of the Natriuretic Peptide System. *Hypertension* 49, 419–426.
- Gay, W.A., 1975. Potassium-Induced Cardioplegia. *Ann. Thorac. Surg.* 20, 95–100.
- Goette, A., Kalman, J.M., Aguinaga, L., Akar, J., Cabrera, J.A., Chen, S.A., Chugh, S.S., Corradi, D., D'Avila, A., Dobrev, D., Fenelon, G., Gonzalez, M., Hatem, S.N., Helm, R., Hindricks, G., Ho, S.Y., Hoit, B., Jalife, J., Kim, Y.H., Lip, G.Y.H., Ma, C.S., Marcus, G.M., Murray, K., Nogami, A., Sanders, P., Uribe, W., Van Wagoner, D.R., Nattel, S., 2017. EHRA/HRS/APHRS/SOLAECE expert consensus on atrial cardiomyopathies: Definition, characterization, and clinical implication. *Hear. Rhythm* 14, e3–e40.
- Goetze, J.P., Bruneau, B.G., Ramos, H.R., Ogawa, T., de Bold, M.K., de Bold, A.J., 2020. Cardiac natriuretic peptides. *Nat. Rev. Cardiol.* 17, 698–717.
- Golias, C., Charalabopoulos, A., Stagikas, D., Charalabopoulos, K., Batistatou, A., 2007. The kinin system--bradykinin: biological effects and clinical implications. Multiple role of the kinin system--bradykinin. *Hippokratia* 11, 124–128.
- Green, C.P., Porter, C.B., Bresnahan, D.R., Spertus, J.A., 2000. Development and Evaluation of the Kansas City Cardiomyopathy Questionnaire: A New Health Status Measure for Heart Failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 35, 1245–1255.
- Gros, D.B., Jongsma, H.J., 1996. Connexins in mammalian heart function. *Bioessays* 18, 719–730.
- Gu, J., Noe, A., Chandra, P., Al-Fayoumi, S., Ligueros-Saylan, M., Sarangapani, R., Maahs, S., Ksander, G., Rigel, D.F., Jeng, A.Y., Lin, T.-H., Zheng, W., Dole, W.P., 2010. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of LCZ696, a Novel Dual-Acting Angiotensin Receptor-Nepilysin Inhibitor (ARNi). *J. Clin. Pharmacol.*

6 Quellenverzeichnis

- 50, 401–414.
- Guerra, F., Ammendola, E., Ziacchi, M., Aspromonte, V., Pellegrino, P.L., Del Giorno, G., Dell’Era, G., Pimpini, L., Santoro, F., Floris, R., Stronati, G., Nigro, G., Paolisso, P., Guido, A., Maglia, G., Brunetti, N.D., Carbone, A., Gravellone, M., Antonicelli, R., Cannone, M., Accogli, M., Dello Russo, A., Palmisano, P., 2021. Effect of SACubitril/Valsartan on left vEntricular ejection fraction and on the potential indication for Implantable Cardioverter Defibrillator in primary prevention: the SAVE-ICD study. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 77, 1835–1842.
- Guerra, F., Pimpini, L., Flori, M., Contadini, D., Stronati, G., Gioacchini, F., Massara, M.F., Gennaro, F., Antonicelli, R., Busacca, P., Luzi, M., Dello Russo, A., Marchese, P., 2020. Sacubitril/valsartan reduces atrial fibrillation and supraventricular arrhythmias in patients with HFrEF and remote monitoring: preliminary data from the SAVE THE RHYTHM. *Eur. Heart J.* 41.
- Guo, S., Goetze, J.P., Jeppesen, J.L., Burnett, J.C., Olesen, J., Jansen-Olesen, I., Ashina, M., 2015. Effect of natriuretic peptides on cerebral artery blood flow in healthy volunteers. *Peptides* 74, 33–42.
- Gwathmey, J. K., Hajjar, R.J., Solaro, R.J., 1991. Contractile deactivation and uncoupling of crossbridges. Effects of 2,3-butanedione monoxime on mammalian myocardium. *Circ. Res.* 69, 1280–1292.
- Gwathmey, J K, Grossman, W, Morgan, J P, Gwathmey, Judith K, Warren, S.E., Briggs, G.M., Copelas, L., Feldman, M.D., Phillips, P.J., Callahan, M., Schoen, F.J., Grossman, William, Morgan, James P, 1991. Diastolic dysfunction in hypertrophic cardiomyopathy . Effect on active force generation during systole . *J. Clin. Invest.* 87, 1023–1031.
- Habibi, M., Chahal, H., Opdahl, A., Gjesdal, O., Helle-Valle, T.M., Heckbert, S.R., McClelland, R., Wu, C., Shea, S., Hundley, G., Bluemke, D.A., Lima, J.A.C., 2014. Association of CMR-Measured LA Function With Heart Failure Development. *JACC Cardiovasc. Imaging* 7, 570–579.
- Hanft, L.M., Korte, F.S., McDonald, K.S., 2008. Cardiac function and modulation of sarcomeric function by length. *Cardiovasc. Res.* 77, 627–636.
- Hanouz, J.-L., Yvon, A., Massetti, M., Lepage, O., Babatasi, G., Khayat, A., Bricard, H., Gérard, J.-L., 2002. Mechanisms of desflurane-induced preconditioning in isolated human right atria in vitro. *Anesthesiology* 97, 33–41.
- Harshali, P., Adrian, K., Nicole, Y., F, H.A., 2015. Abstract 17368: Years of Life Lost Due to Heart Failure in the United States (US). *Circulation* 132, A17368–A17368.
- Hartupee, J., Mann, D.L., 2018. Neurohormonal activation in heart failure with reduced ejection fraction. *Nat. Rev. Cardiol.* 14, 30–38.
- Heijman, J., Voigt, N., Nattel, S., Dobrev, D., 2014. Cellular and molecular electrophysiology of atrial fibrillation initiation, maintenance, and progression. *Circ. Res.* 114, 1483–1499.
- Hillmeister, P., Bondke Persson, A., 2020. Bradykinin-from snake poison to therapeutic options. *Acta Physiol. (Oxf)*.
- Hindricks, G., Potpara, T., Dagres, N., Arbelo, E., Bax, J.J., Blomström-Lundqvist, C., Boriani, G., Castella, M., Dan, G.-A., Dilaveris, P.E., Fauchier, L., Filippatos, G., Kalman, J.M., La Meir, M., Lane, D.A., Lebeau, J.-P., Lettino, M., Lip, G.Y.H., Pinto, F.J., Thomas, G.N., Valgimigli, M., Van Gelder, I.C., Van Putte, B.P., Watkins, C.L., 2021. 2020 ESC Guidelines for the diagnosis and management of atrial fibrillation developed in collaboration with the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS): The Task Force for the diagnosis and

6 Quellenverzeichnis

- management of atrial fibrillation of the Europe. *Eur. Heart J.* 42, 373–498.
- Hohendanner, F., Messroghli, D., Bode, D., Blaschke, F., Parwani, A., Boldt, L.H., Heinzel, F.R., 2018. Atrial remodelling in heart failure: recent developments and relevance for heart failure with preserved ejection fraction. *ESC Hear. Fail.* 5, 211–221.
- Hoit, B.D., 2014. Left atrial size and function: Role in prognosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 63, 493–505.
- Hollister, A.S., Rodeheffer, R.J., White, F.J., Potts, J.R., Imada, T., Inagami, T., 1989. Clearance of atrial natriuretic factor by lung, liver, and kidney in human subjects and the dog. *J. Clin. Invest.* 83, 623–628.
- Holtwick, R., van Eickels, M., Skryabin, B. V., Baba, H.A., Bubikat, A., Begrow, F., Schneider, M.D., Garbers, D.L., Kuhn, M., 2003. Pressure-independent cardiac hypertrophy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of the atrial natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A. *J. Clin. Invest.* 111, 1399–1407.
- Holubarsch, C., Hasenfuss, G., Schmidt-Schweda, S., Knorr, A., Pieske, B., Ruf, T., Fasol, R., Just, H., 1993. Angiotensin I and II exert inotropic effects in atrial but not in ventricular human myocardium an in vitro study under physiological experimental conditions. *Circulation* 88, 1228–1237.
- Holubarsch, C., Schneider, R., Pieske, B., Ruf, T., Hasenfuss, G., Fraedrich, G., Posival, H., Just, H., 1995. Positive and Negative Inotropic Effects of dl-Sotalol and d-Sotalol in Failing and Nonfailing Human Myocardium Under Physiological Experimental Conditions. *Circulation* 92, 2904–2910.
- Hong, T., Shaw, R.M., 2017. Cardiac T-Tubule Microanatomy and Function. *Physiol. Rev.* 97, 227–252.
- Hubers, S.A., Brown, N.J., 2016. Combined angiotensin receptor antagonism and neprilysin inhibition. *Circulation* 133, 1115–1124.
- Huntley, B.K., Sandberg, S.M., Heublein, D.M., Jenson Sangaralingham, S., Burnett, J.C., Ichiki, T., 2015. ProB-type natriuretic peptide-1-108 processing and degradation in human heart failure. *Circ. Hear. Fail.* 8, 89–97.
- Iwashiro, K., Criniti, A., Sinatra, R., Dawodu, A.A., d'Amati, G., Monti, F., Pannarale, L., Bernucci, P., Brancaccio, G.L., Vetuschi, A., Gaudio, E., Gallo, P., Puddu, P.E., 1997. Felodipine protects human atrial muscle from hypoxia-reoxygenation dysfunction: a force-frequency relationship study in an in vitro model of stunning. *Int. J. Cardiol.* 62, 107–132.
- James, S.L., Abate, D., Abate, K.H., Abay, S.M., Abbafati, C., Abbasi, N., Abastabar, H., Abd-Allah, F., Abdela, J., Abdelalim, A., Abdollahpour, I., Abdulkader, R.S., Abebe, Z., Abera, S.F., Abil, O.Z., Abraha, H.N., Abu-Raddad, L.J., Abu-Rmeileh, N.M.E., Accrombessi, M.M.K., Acharya, D., Acharya, P., Ackerman, I.N., Adamu, A.A., Adebayo, O.M., Adekanmbi, V., Adetokunboh, O.O., Adib, M.G., Adsuar, J.C., Afanvi, K.A., Afarideh, M., Afshin, A., Agarwal, G., Agesa, K.M., Aggarwal, R., Aghayan, S.A., Agrawal, S., Ahmadi, A., Ahmadi, M., Ahmadi, H., Ahmed, M.B., Aichour, A.N., Aichour, I., Aichour, M.T.E., Akinyemiju, T., Akseer, N., Al-Aly, Z., Al-Eyadhy, A., Al-Mekhlafi, H.M., Al-Raddadi, R.M., Alahdab, F., Alam, K., Alam, T., Alashi, A., Alavian, S.M., Alene, K.A., Alijanzadeh, M., Alizadeh-Navaei, R., Aljunid, S.M., Alkerwi, A., Alla, F., Allebeck, P., Alouani, M.M.L., Altirkawi, K., Alvis-Guzman, N., Amare, A.T., Aminde, L.N., Ammar, W., Amoako, Y.A., Anber, N.H., Andrei, C.L., Androudi, S., Anmut, M.D., Anjomshoa, M., Ansha, M.G., Antonio, C.A.T., Anwari, P., Arabloo, J., Arauz, A., Aremu, O., Ariani, F., Armoon, B., Ärnlöv, J., Arora, A., Artaman, A., Aryal, K.K., Asayesh, H., Asghar, R.J., Ataro, Z., Atre, S.R.,

6 Quellenverzeichnis

Ausloos, M., Avila-Burgos, L., Avokpaho, E.F.G.A., Awasthi, A., Ayala Quintanilla, B.P., Ayer, R., Azzopardi, P.S., Babazadeh, A., Badali, H., Badawi, A., Bali, A.G., Ballesteros, K.E., Ballew, S.H., Banach, M., Banoub, J.A.M., Banstola, A., Barac, A., Barboza, M.A., Barker-Collo, S.L., Bärnighausen, T.W., Barrero, L.H., Baune, B.T., Bazargan-Hejazi, S., Bedi, N., Beghi, E., Behzadifar, Masoud, Behzadifar, Meysam, Béjot, Y., Belachew, A.B., Belay, Y.A., Bell, M.L., Bello, A.K., Bensenor, I.M., Bernabe, E., Bernstein, R.S., Beuran, M., Beyranvand, T., Bhala, N., Bhattarai, S., Bhaumik, S., Bhutta, Z.A., Biadgo, B., Bijani, A., Bikbov, B., Bilano, V., Bililign, N., Bin Sayeed, M.S., Bisanzio, D., Blacker, B.F., Blyth, F.M., Bou-Orm, I.R., Boufous, S., Bourne, R., Brady, O.J., Brainin, M., Brant, L.C., Brazinova, A., Breitborde, N.J.K., Brenner, H., Briant, P.S., Briggs, A.M., Briko, A.N., Britton, G., Brugha, T., Buchbinder, R., Busse, R., Butt, Z.A., Cahuana-Hurtado, L., Cano, J., Cárdenas, R., Carrero, J.J., Carter, A., Carvalho, F., Castañeda-Orjuela, C.A., Castillo Rivas, J., Castro, F., Catalá-López, F., Cercy, K.M., Cerin, E., Chaiah, Y., Chang, A.R., Chang, H.-Y., Chang, J.-C., Charlson, F.J., Chattopadhyay, A., Chattu, V.K., Chaturvedi, P., Chiang, P.P.-C., Chin, K.L., Chitheer, A., Choi, J.-Y.J., Chowdhury, R., Christensen, H., Christopher, D.J., Cicuttini, F.M., Ciobanu, L.G., Cirillo, M., Claro, R.M., Collado-Mateo, D., Cooper, C., Coresh, J., Cortesi, P.A., Cortinovis, M., Costa, M., Cousin, E., Criqui, M.H., Cromwell, E.A., Cross, M., Crump, J.A., Dadi, A.F., Dandona, L., Dandona, R., Dargan, P.I., Daryani, A., Das Gupta, Rajat, Das Neves, J., Dasa, T.T., Davey, G., Davis, A.C., Davitoiu, D.V., De Courten, B., De La Hoz, F.P., De Leo, D., De Neve, J.-W., Degefa, M.G., Degenhardt, L., Deiparine, S., Dellavalle, R.P., Demoz, G.T., Deribe, K., Dervenis, N., Des Jarlais, D.C., Dessie, G.A., Dey, S., Dharmaratne, S.D., Dinberu, M.T., Dirac, M.A., Djalalinia, S., Doan, L., Dokova, K., Doku, D.T., Dorsey, E.R., Doyle, K.E., Driscoll, T.R., Dubey, M., Dubljanin, E., Duken, E.E., Duncan, B.B., Duraes, A.R., Ebrahimi, H., Ebrahimpour, S., Echko, M.M., Edvardsson, D., Effiong, A., Ehrlich, J.R., El Bcheraoui, C., El Sayed Zaki, M., El-Khatib, Z., Elkout, H., Elyazar, I.R.F., Enayati, A., Endries, A.Y., Er, B., Erskine, H.E., Eshрати, B., Eskandarieh, S., Esteghamati, A., Esteghamati, S., Fakhim, H., Fallah Omrani, V., Faramarzi, M., Fareed, M., Farhadi, F., Farid, T.A., Farinha, C.S.E. sá, Farioli, A., Faro, A., Farvid, M.S., Farzadfar, F., Feigin, V.L., Fentahun, N., Fereshtehnejad, S.-M., Fernandes, E., Fernandes, J.C., Ferrari, A.J., Feyissa, G.T., Filip, I., Fischer, F., Fitzmaurice, C., Foigt, N.A., Foreman, K.J., Fox, J., Frank, T.D., Fukumoto, T., Fullman, N., Fürst, T., Furtado, J.M., Futran, N.D., Gall, S., Ganji, M., Gankpe, F.G., Garcia-Basteiro, A.L., Gardner, W.M., Gebre, A.K., Gebremedhin, A.T., Gebremichael, T.G., Gelano, T.F., Geleijnse, J.M., Genova-Maleras, R., Geramo, Y.C.D., Gething, P.W., Gezae, K.E., Ghadiri, K., Ghasemi Falavarjani, K., Ghasemi-Kasman, M., Ghimire, M., Ghosh, R., Ghoshal, A.G., Giampaoli, S., Gill, P.S., Gill, T.K., Ginawi, I.A., Giussani, G., Gnedovskaya, E. V., Goldberg, E.M., Goli, S., Gómez-Dantés, H., Gona, P.N., Gopalani, S.V., Gorman, T.M., Goulart, A.C., Goulart, B.N.G., Grada, A., Grams, M.E., Grosso, G., Gughani, H.C., Guo, Y., Gupta, P.C., Gupta, Rahul, Gupta, Rajeev, Gupta, T., Gyawali, B., Haagsma, J.A., Hachinski, V., Hafezi-Nejad, N., Haghparast Bidgoli, H., Hagos, T.B., Hailu, G.B., Haj-Mirzaian, Arvin, Haj-Mirzaian, Arya, Hamadeh, R.R., Hamidi, S., Handal, A.J., Hankey, G.J., Hao, Y., Harb, H.L., Harikrishnan, S., Haro, J.M., Hasan, M., Hassankhani, H., Hassen, H.Y., Havmoeller, R., Hawley, C.N., Hay, R.J., Hay, S.I., Hedayatizadeh-Omran, A., Heibati, B., Hendrie, D., Henok, A., Herteliu, C.,

6 Quellenverzeichnis

Heydarpour, S., Hibstu, D.T., Hoang, H.T., Hoek, H.W., Hoffman, H.J., Hole, M.K., Homaie Rad, E., Hoogar, P., Hosgood, H.D., Hosseini, S.M., Hosseinzadeh, M., Hostiuc, M., Hostiuc, S., Hotez, P.J., Hoy, D.G., Hsairi, M., Htet, A.S., Hu, G., Huang, J.J., Huynh, C.K., Iburg, K.M., Ikeda, C.T., Ileanu, B., Ilesanmi, O.S., Iqbal, U., Irvani, S.S.N., Irvine, C.M.S., Islam, S.M.S., Islami, F., Jacobsen, K.H., Jahangiry, L., Jahanmehr, N., Jain, S.K., Jakovljevic, M., Javanbakht, M., Jayatilleke, A.U., Jeemon, P., Jha, R.P., Jha, V., Ji, J.S., Johnson, C.O., Jonas, J.B., Jozwiak, J.J., Jungari, S.B., Jürisson, M., Kabir, Z., Kadel, R., Kahsay, A., Kalani, R., Kanchan, T., Karami, M., Karami Matin, B., Karch, A., Karema, C., Karimi, N., Karimi, S.M., Kasaeian, A., Kassa, D.H., Kassa, G.M., Kassa, T.D., Kassebaum, N.J., Katikireddi, S.V., Kawakami, N., Karyani, A.K., Keighobadi, M.M., Keiyoro, P.N., Kemmer, L., Kemp, G.R., Kengne, A.P., Keren, A., Khader, Y.S., Khafaei, B., Khafaie, M.A., Khajavi, A., Khalil, I.A., Khan, E.A., Khan, M.S., Khan, M.A., Khang, Y.-H., Khazaei, M., Khoja, A.T., Khosravi, A., Khosravi, M.H., Kiadaliri, A.A., Kiirithio, D.N., Kim, C.-I., Kim, D., Kim, P., Kim, Y.-E., Kim, Y.J., Kimokoti, R.W., Kinfu, Y., Kisa, A., Kissimova-Skarbek, K., Kivimäki, M., Knudsen, A.K.S., Kocarnik, J.M., Kochhar, S., Kokubo, Y., Kolola, T., Kopec, J.A., Kosen, S., Kotsakis, G.A., Koul, P.A., Koyanagi, A., Kravchenko, M.A., Krishan, K., Krohn, K.J., Kuate Defo, B., Kucuk Bicer, B., Kumar, G.A., Kumar, M., Kyu, H.H., Lad, D.P., Lad, S.D., Lafranconi, A., Laloo, R., Lallukka, T., Lami, F.H., Lansingh, V.C., Latifi, A., Lau, K.M.-M., Lazarus, J. V., Leasher, J.L., Ledesma, J.R., Lee, P.H., Leigh, J., Leung, J., Levi, M., Lewycka, S., Li, S., Li, Y., Liao, Y., Liben, M.L., Lim, L.-L., Lim, S.S., Liu, S., Lodha, R., Looker, K.J., Lopez, A.D., Lorkowski, S., Lotufo, P.A., Low, N., Lozano, R., Lucas, T.C.D., Lucchesi, L.R., Lunevicius, R., Lyons, R.A., Ma, S., Macarayan, E.R.K., Mackay, M.T., Madotto, F., Magdy Abd El Razek, H., Magdy Abd El Razek, M., Maghavani, D.P., Mahotra, N.B., Mai, H.T., Majdan, M., Majdzadeh, R., Majeed, A., Malekzadeh, R., Malta, D.C., Mamun, A.A., Manda, A.-L., Manguerra, H., Manhertz, T., Mansournia, M.A., Mantovani, L.G., Mapoma, C.C., Maravilla, J.C., Marcenes, W., Marks, A., Martins-Melo, F.R., Martopullo, I., März, W., Marzan, M.B., Mashamba-Thompson, T.P., Massenburg, B.B., Mathur, M.R., Matsushita, K., Maulik, P.K., Mazidi, M., McAlinden, C., McGrath, J.J., McKee, M., Mehndiratta, M.M., Mehrotra, R., Mehta, K.M., Mehta, V., Mejia-Rodriguez, F., Mekonen, T., Melese, A., Melku, M., Meltzer, M., Memiah, P.T.N., Memish, Z.A., Mendoza, W., Mengistu, D.T., Mengistu, G., Mensah, G.A., Mereta, S.T., Meretoja, A., Meretoja, T.J., Mestrovic, T., Mezerji, N.M.G., Miazgowski, B., Miazgowski, T., Milliar, A.I., Miller, T.R., Miltz, B., Mini, G.K., Mirarefin, M., Mirrakhimov, E.M., Misganaw, A.T., Mitchell, P.B., Mitiku, H., Moazen, B., Mohajer, B., Mohammad, K.A., Mohammadifard, N., Mohammadnia-Afrouzi, M., Mohammed, M.A., Mohammed, S., Mohebi, F., Moitra, M., Mokdad, A.H., Molokhia, M., Monasta, L., Moodley, Y., Moosazadeh, M., Moradi, G., Moradi-Lakeh, M., Moradinazar, M., Moraga, P., Morawska, L., Moreno Velásquez, I., Morgado-Da-Costa, J., Morrison, S.D., Moschos, M.M., Mountjoy-Venning, W.C., Mousavi, S.M., Mruts, K.B., Muche, A.A., Muchie, K.F., Mueller, U.O., Muhammed, O.S., Mukhopadhyay, S., Muller, K., Mumford, J.E., Murhekar, M., Musa, J., Musa, K.I., Mustafa, G., Nabhan, A.F., Nagata, C., Naghavi, M., Naheed, A., Nahvijou, A., Naik, G., Naik, N., Najafi, F., Naldi, L., Nam, H.S., Nangia, V., Nansseu, J.R., Nascimento, B.R., Natarajan, G., Neamati, N., Negoi, I., Negoi, R.I., Neupane, S., Newton, C.R.J., Ngunjiri, J.W., Nguyen, A.Q., Nguyen, Ha Thu, Nguyen, H.L.T., Nguyen, Huong

6 Quellenverzeichnis

Thanh, Nguyen, L.H., Nguyen, M., Nguyen, N.B., Nguyen, S.H., Nichols, E., Ningrum, D.N.A., Nixon, M.R., Nolutshungu, N., Nomura, S., Norheim, O.F., Noroozi, M., Norrving, B., Noubiap, J.J., Nouri, H.R., Nourollahpour Shiadeh, M., Nowroozi, M.R., Nsoesie, E.O., Nyasulu, P.S., Odell, C.M., Ofori-Asenso, R., Ogbo, F.A., Oh, I.-H., Oladimeji, O., Olagunju, A.T., Olagunju, T.O., Olivares, P.R., Olsen, H.E., Olusanya, B.O., Ong, K.L., Ong, S.K., Oren, E., Ortiz, A., Ota, E., Otstavnov, S.S., Øverland, S., Owolabi, M.O., P A, M., Pacella, R., Pakpour, A.H., Pana, A., Panda-Jonas, S., Parisi, A., Park, E.-K., Parry, C.D.H., Patel, S., Pati, S., Patil, S.T., Patle, A., Patton, G.C., Paturi, V.R., Paulson, K.R., Pearce, N., Pereira, D.M., Perico, N., Pesudovs, K., Pham, H.Q., Phillips, M.R., Pigott, D.M., Pillay, J.D., Piradov, M.A., Pirsaeheb, M., Pishgar, F., Plana-Ripoll, O., Plass, D., Polinder, S., Popova, S., Postma, M.J., Pourshams, A., Poustchi, H., Prabhakaran, D., Prakash, S., Prakash, V., Purcell, C.A., Purwar, M.B., Qorbani, M., Quistberg, D.A., Radfar, A., Rafay, A., Rafiei, A., Rahim, F., Rahimi, K., Rahimi-Movaghar, A., Rahimi-Movaghar, V., Rahman, M., Rahman, M.H. ur, Rahman, M.A., Rahman, S.U., Rai, R.K., Rajati, F., Ram, U., Ranjan, P., Ranta, A., Rao, P.C., Rawaf, D.L., Rawaf, S., Reddy, K.S., Reiner, R.C., Reinig, N., Reitsma, M.B., Remuzzi, G., Renzaho, A.M.N., Resnikoff, S., Rezaei, S., Rezai, M.S., Ribeiro, A.L.P., Roberts, N.L.S., Robinson, S.R., Roever, L., Ronfani, L., Roshandel, G., Rostami, A., Roth, G.A., Roy, A., Rubagotti, E., Sachdev, P.S., Sadat, N., Saddik, B., Sadeghi, E., Saeedi Moghaddam, S., Safari, H., Safari, Y., Safari-Faramani, R., Safdarian, M., Safi, S., Safiri, S., Sagar, R., Sahebkar, A., Sahraian, M.A., Sajadi, H.S., Salam, N., Salama, J.S., Salamati, P., Saleem, K., Saleem, Z., Salimi, Y., Salomon, J.A., Salvi, S.S., Salz, I., Samy, A.M., Sanabria, J., Sang, Y., Santomauro, D.F., Santos, I.S., Santos, J.V., Santric Milicevic, M.M., Sao Jose, B.P., Sardana, M., Sarker, A.R., Sarrafzadegan, N., Sartorius, B., Sarvi, S., Sathian, B., Satpathy, M., Sawant, A.R., Sawhney, M., Saxena, S., Saylan, M., Schaeffner, E., Schmidt, M.I., Schneider, I.J.C., Schöttker, B., Schwebel, D.C., Schwendicke, F., Scott, J.G., Sekerija, M., Sepanlou, S.G., Serván-Mori, E., Seyedmousavi, S., Shabaninejad, H., Shafieesabet, A., Shahbazi, M., Shaheen, A.A., Shaikh, M.A., Shams-Beyranvand, M., Shamsi, M., Shamsizadeh, M., Sharafi, H., Sharafi, K., Sharif, M., Sharif-Alhoseini, M., Sharma, M., Sharma, R., She, J., Sheikh, A., Shi, P., Shibuya, K., Shigematsu, M., Shiri, R., Shirkoohi, R., Shishani, K., Shiue, I., Shokraneh, F., Shoman, H., Shrime, M.G., Si, S., Siabani, S., Siddiqi, T.J., Sigfusdottir, I.D., Sigurvinsdottir, R., Silva, J.P., Silveira, D.G.A., Singam, N.S.V., Singh, J.A., Singh, N.P., Singh, V., Sinha, D.N., Skiadaresi, E., Slepak, E.L.N., Sliwa, K., Smith, D.L., Smith, M., Soares Filho, A.M., Sobaih, B.H., Sobhani, S., Sobngwi, E., Soneji, S.S., Soofi, M., Soosaraei, M., Sorensen, R.J.D., Soriano, J.B., Soyiri, I.N., Sposato, L.A., Sreeramareddy, C.T., Srinivasan, V., Stanaway, J.D., Stein, D.J., Steiner, C., Steiner, T.J., Stokes, M.A., Stovner, L.J., Subart, M.L., Sudaryanto, A., Sufiyan, M.B., Sunguya, B.F., Sur, P.J., Sutradhar, I., Sykes, B.L., Sylte, D.O., Tabarés-Seisdedos, R., Tadakamadla, S.K., Tadesse, B.T., Tandon, N., Tassew, S.G., Tavakkoli, M., Taveira, N., Taylor, H.R., Tehrani-Banihashemi, A., Tekalign, T.G., Tekelemedhin, S.W., Tekle, M.G., Temesgen, H., Temsah, M.-H., Temsah, O., Terkawi, A.S., Teweldemedhin, M., Thankappan, K.R., Thomas, N., Tilahun, B., To, Q.G., Tonelli, M., Topor-Madry, R., Topouzis, F., Torre, A.E., Tortajada-Girbés, M., Touvier, M., Tovani-Palone, M.R., Towbin, J.A., Tran, B.X., Tran, K.B., Troeger, C.E., Truelsen, T.C., Tsilimbaris, M.K., Tsoi, D., Tudor Car, L., Tuzcu, E.M., Ukwaja, K.N., Ullah, I., Undurraga, E.A., Unutzer, J., Updike, R.L.,

6 Quellenverzeichnis

- Usman, M.S., Uthman, O.A., Vaduganathan, M., Vaezi, A., Valdez, P.R., Varughese, S., Vasankari, T.J., Venketasubramanian, N., Villafaina, S., Violante, F.S., Vladimirov, S.K., Vlassov, V., Vollset, S.E., Vosoughi, K., Vujcic, I.S., Wagnew, F.S., Waheed, Y., Waller, S.G., Wang, Y., Wang, Y.-P., Weiderpass, E., Weintraub, R.G., Weiss, D.J., Weldegebreab, F., Weldegewergs, K.G., Werdecker, A., West, T.E., Whiteford, H.A., Widecka, J., Wijeratne, T., Wilner, L.B., Wilson, S., Winkler, A.S., Wiyeh, A.B., Wiysonge, C.S., Wolfe, C.D.A., Woolf, A.D., Wu, S., Wu, Y.-C., Wyper, G.M.A., Xavier, D., Xu, G., Yadgir, S., Yadollahpour, A., Yahyazadeh Jabbari, S.H., Yamada, T., Yan, L.L., Yano, Y., Yaseri, M., Yasin, Y.J., Yeshaneh, A., Yimer, E.M., Yip, P., Yisma, E., Yonemoto, N., Yoon, S.-J., Yotebieng, M., Younis, M.Z., Yousefifard, M., Yu, C., Zadnik, V., Zaidi, Z., Zaman, S. Bin, Zamani, M., Zare, Z., Zeleke, A.J., Zenebe, Z.M., Zhang, K., Zhao, Z., Zhou, M., Zodpey, S., Zucker, I., Vos, T., Murray, C.J.L., 2018. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* 392, 1789–1858.
- Jhund, P.S., MacIntyre, K., Simpson, C.R., Lewsey, J.D., Stewart, S., Redpath, A., Chalmers, J.W.T., Capewell, S., McMurray, J.J.V., 2009. Long-term trends in first hospitalization for heart failure and subsequent survival between 1986 and 2003. A population study of 5.1 million people. *Circulation* 119, 515–523.
- Kashou, A.H., Basit, H., Chhabra, L., 2021. Physiology, Sinoatrial Node. In: *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Kawai, M., Jin, J.-P., 2021. Mechanisms of Frank-Starling law of the heart and stretch activation in striated muscles may have a common molecular origin. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 42, 355–366.
- Kayrak, M., Bacaksiz, A., Vatankulu, M.A., Ayhan, S.S., Ari, H., Kaya, Z., Ozdemir, K., 2010. The effects of spironolactone on atrial remodeling in patients with preserved left ventricular function after an acute myocardial infarction: A randomized follow-up study. *Coron. Artery Dis.* 21, 477–485.
- Kerkelä, R., Ulvila, J., Magga, J., 2015. Natriuretic Peptides in the Regulation of Cardiovascular Physiology and Metabolic Events. *J. Am. Heart Assoc.* 4, e002423.
- Kirchhof, P., Camm, A.J., Goette, A., Brandes, A., Eckardt, L., Elvan, A., Fetsch, T., van Gelder, I.C., Haase, D., Haegeli, L.M., Hamann, F., Heidbüchel, H., Hindricks, G., Kautzner, J., Kuck, K.-H., Mont, L., Ng, G.A., Rekosz, J., Schoen, N., Schotten, U., Suling, A., Taggeselle, J., Themistoclakis, S., Vettorazzi, E., Vardas, P., Wegscheider, K., Willems, S., Crijns, H.J.G.M., Breithardt, G., 2020. Early Rhythm-Control Therapy in Patients with Atrial Fibrillation. *N. Engl. J. Med.* 383, 1305–1316.
- Knowles, J.W., Esposito, G., Mao, L., Hagaman, J.R., Fox, J.E., Smithies, O., Rockman, H.A., Maeda, N., 2001. Pressure-independent enhancement of cardiac hypertrophy in natriuretic peptide receptor A-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 107, 975–984.
- Koch-Weser, J., 1963. Effect of rate changes on strength and time course of contraction of papillary muscle. *Am. J. Physiol.* 204, 451–457.
- Kockskämper, J., von Lewinski, D., Khafaga, M., Elgner, A., Grimm, M., Eschenhagen, T., Gottlieb, P.A., Sachs, F., Pieske, B., 2008. The slow force response to stretch in atrial and ventricular myocardium from human heart: Functional relevance and subcellular mechanisms. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 97,

6 Quellenverzeichnis

250–267.

- Krüger, M., Kötter, S., Grützner, A., Lang, P., Andresen, C., Redfield, M.M., Butt, E., dos Remedios, C.G., Linke, W.A., 2009. Protein kinase G modulates human myocardial passive stiffness by phosphorylation of the titin springs. *Circ. Res.* 104, 87–94.
- Leite-Moreira, A.M., Almeida-Coelho, J., Neves, J.S., Pires, A.L., Ferreira-Martins, J., Castro-Ferreira, R., Ladeiras-Lopes, R., Conceição, G., Miranda-Silva, D., Rodrigues, P., Hamdani, N., Herwig, M., Falcão-Pires, I., Paulus, W.J., Linke, W.A., Lourenço, A.P., Leite-Moreira, A.F., 2018. Stretch-induced compliance: A novel adaptive biological mechanism following acute cardiac load. *Cardiovasc. Res.* 114, 656–667.
- Louch, W.E., Sheehan, K.A., Wolska, B.M., 2011. Methods in cardiomyocyte isolation, culture, and gene transfer. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 51, 288–298.
- Luong, C., Thompson, D.J.S., Bennett, M., Gin, K., Jue, J., Barnes, M.E., Colley, P., Tsang, T.S.M., 2015. Right atrial volume is superior to left atrial volume for prediction of atrial fibrillation recurrence after direct current cardioversion. *Can. J. Cardiol.* 31, 29–35.
- Madamanchi, A., 2007. Beta-adrenergic receptor signaling in cardiac function and heart failure. *McGill J. Med. MJM an Int. forum Adv. Med. Sci. by students* 10, 99–104.
- Maggioni, A.P., Dahlström, U., Filippatos, G., Chioncel, O., Leiro, M.C., Drozdz, J., Fruhwald, F., Gullestad, L., Logeart, D., Fabbri, G., Urso, R., Metra, M., Parissis, J., Persson, H., Ponikowski, P., Rauchhaus, M., Voors, A.A., Nielsen, O.W., Zannad, F., Tavazzi, L., Alonso, A., Ferrari, R., Komajda, M., Wood, D., Manini, M., Taylor, C., Laroche, C., Fiorucci, E., Lucci, D., Gonzini, L., Auer, J., Oberrauner, A., Schumacher, M., Ebner, C., Hallas, A., Espersen, G., Gustafsson, F., Mattsson, N., Egstrup, K., Aagaard, S., Gohr, T., Huld, K., Knudsen, A., Refsgaard, J., Charniot, J., Juillard, A., Pon-Gabrielsen, P., Douna, F., Jondeau, G., Jourdain, P., Michel, L., Hamm, C., Lehinant, S., Rieth, A., Goeing, O., Schultheiss, H.P., Von-Schlippenbach, J., Knollmann, R., Neubüser, C., Katus, H.A., Taeger, T., Zugck, C., Fink, H., Schulz, J., Held, S., Karmann, W., Kreuzer, J., Nitsche, K., Winter, K., Fahrlich, A., Bruederlein, K., Turan, C.H., Berentelg, J., Ittel, T., Rubens, C., Hanke, M., Stoerk, S., Chrysohoou, C., Kaldara, E., Karavidas, A., Margari, R., Matzaraki, V., Nanas, J., Pozios, I., Psarogiannakopoulos, P., Pyrgakis, V., Stefanadis, C., Terrovitis, J., Trikas, A., Xydonas, S., Patrianakos, A., Vardas, P., Douras, A., Nastas, J., Ntertsas, K., Tsaknakis, T., Midi, P., Pajes, G., Moretti, L., Partemi, M., Barberini, F., Branzi, A., Gallelli, I., Grigioni, F., Ionico, T., Pasquale, F., Cas, L., Delmagro, F., Tanghetti, E., Vaccari, A., Mercuro, G., Arcuri, G.M., Marinacci, L., Severini, D., Cosmi, F., Bosi, S., Di Tano, G., Pirelli, S., Ferrari, R., Fucili, A., Minneci, C., Santoro, G.M., Correale, M., Di Biase, M., Buccolieri, M., Mandorla, S., Martinelli, S., Barbiero, M., Giordano, A., Zanelli, E., Agostoni, P., Fiorentini, C., Salvioni, E., Leuzzi, C., Modena, M.G., Reggiani, L., Cobelli, F., Opasich, C., Baldini, P., Romei, M., Pulitano, G., Ruggeri, A., Bologna, F., Piovaccari, G., Brasolin, B., Fedele, F., Merlo, M., Sinagra, G., Albanese, M.C., Miani, D., Linssen, G., Rodijk, E., Pinto, Y., Van Donk, P., Dunselman, P., Lok, D., Brouwers, F., De Jong, R.M., Boen, R., Hole, T., Rasmussen, L., Christiansen, E.M., Gjertsen, E., Lyng, J., German, M., Hogalmen, G., Skardal, R., Apelland, T., Borgen, M., Forfang, E., Baak, T., Dickstein, K., Olsen, I., Stachurski, D., Juszczyk, Z., Stankala, S., Gilewski, W., Sinkiewicz, W., Kasztelowicz, P.,

6 Quellenverzeichnis

- Gabryel, J., Kardaszewicz, P., Lazorko-Piega, M., Bellwon, J., Mosakowska, K., Rynkiewicz, A., Olczyk, S., Pagorek, M., Bartlinski, R., Borej, G., Tarchalski, J., Bartkowiak, R., Sosnowska-Pasiarska, B., Wozakowska-Kaplon, B., Krzeminski, A., Bury, K., Grzegorzko, A., Mirek-Bryniarska, E., Nessler, J., Zabojszcz, M., Broncel, M., Poliwczak, A., Retwinski, A., Soska, K., Grajek, S., Straburzynska-Migaj, E., Kuzniar, J., Rzeszuto, T., Bednarczyk, G., Ruszkowski, P., Piasecka-Krysiak, E., Zambrzycki, J., Nowak, T., Szelemej, R., Balsam, P., Folga, A., Kaplon-Cieslicka, A., Kowalewski, S., Mamcarz, A., Marchel, M., Opolski, G., Welnicki, M., Jankowska, E., Nowak, J., Nowalany-Kozielska, E., Rozentryt, P., Zembala, M., Kleinrok, A., Prokop-Lewicka, G., Kudlinska, B., Radoi, M., Macarie, C., Vinereanu, D., Capalneau, R., Giuca, A., Ionescu, D.D., Nechita, E., Datcu, M., Istrate, C., Vladoianu, M., Christodorescu, R., Salguero, R., Blanco, V.M., Lavilla, M.A., Comin-Colet, J., Cantillo, D., Bernal, J., del Prado, J.M., Pita, A., Aguero, J., Jimenez, J.F., Calvo, F., Gonzalez, R., Molina, B., Luengos, D., Lostal, C., Bonet, L., Gonzalez, P., Soriano, F., Campos, M.J., Karlstrom, P., Nyriinder, I., Olsson, B., Pettersson, T., Stenberg, A., Lindmark, K., Asserlund, B., 2013. EURObservational Research Programme: Regional differences and 1-year follow-up results of the Heart Failure Pilot Survey (ESC-HF Pilot). *Eur. J. Heart Fail.* 15, 808–817.
- Maier, L.S., Barckhausen, P., Weisser, J., Aleksic, I., Baryalei, M., Pieske, B., 2000. Ca(2+) handling in isolated human atrial myocardium. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 279, H952-8.
- Mann, D.L., Kent, R.L., Parsons, B., Cooper, G. 4th, 1992. Adrenergic effects on the biology of the adult mammalian cardiocyte. *Circulation* 85, 790–804.
- Manolis, A.J., Marketou, M.E., Gavras, I., Gavras, H., 2010. Cardioprotective properties of bradykinin: role of the B2 receptor. *Hypertens. Res.* 33, 772–777.
- Mantegazza, V., Volpato, V., Mapelli, M., Sassi, V., Salvioni, E., Mattavelli, I., Tamborini, G., Agostoni, P., Pepi, M., 2021. Cardiac Reverse Remodelling by 2D and 3D Echocardiography in Heart Failure Patients Treated with Sacubitril/Valsartan. *Diagnostics (Basel, Switzerland)* 11.
- Marasciulo, F.L., Montagnani, M., Potenza, M.A., 2006. Endothelin-1: the yin and yang on vascular function. *Curr. Med. Chem.* 13, 1655–1665.
- Marijon, E., Le Heuzey, J.-Y., Connolly, S., Yang, S., Pogue, J., Brueckmann, M., Eikelboom, J., Themeles, E., Ezekowitz, M., Wallentin, L., Yusuf, S., 2013. Causes of death and influencing factors in patients with atrial fibrillation: a competing-risk analysis from the randomized evaluation of long-term anticoagulant therapy study. *Circulation* 128, 2192–2201.
- Marks, A.R., 2003. Calcium and the heart: A question of life and death. *J. Clin. Invest.* 111, 597–600.
- Marrouche, N.F., Brachmann, J., Andresen, D., Siebels, J., Boersma, L., Jordaens, L., Merkely, B., Pokushalov, E., Sanders, P., Proff, J., Schunkert, H., Christ, H., Vogt, J., Bänsch, D., 2018. Catheter Ablation for Atrial Fibrillation with Heart Failure. *N. Engl. J. Med.* 378, 417–427.
- Martens, P., Beliën, H., Dupont, M., Vandervoort, P., Mullens, W., 2018. The reverse remodeling response to sacubitril/valsartan therapy in heart failure with reduced ejection fraction. *Cardiovasc. Ther.* 36, e12435.
- Martens, P., Nuyens, D., Rivero-Ayerza, M., Van Herendaël, H., Vercammen, J., Ceysens, W., Luwel, E., Dupont, M., Mullens, W., 2019. Sacubitril/valsartan reduces ventricular arrhythmias in parallel with left ventricular reverse remodeling in heart failure with reduced ejection fraction. *Clin. Res. Cardiol.* 108,

6 Quellenverzeichnis

1074–1082.

- Matsuda, Y., Toma, Y., Ogawa, H., Matsuzaki, M., Katayama, K., Fujii, T., Yoshino, F., Moritani, K., Kumada, T., Kusakawa, R., 1983. Importance of left atrial function in patients with myocardial infarction. *Circulation* 67, 566–571.
- McDonagh, T.A., Metra, M., Adamo, M., Gardner, R.S., Baumbach, A., Böhm, M., Burri, H., Butler, J., Čelutkienė, J., Chioncel, O., Cleland, J.G.F., Coats, A.J.S., Crespo-Leiro, M.G., Farmakis, D., Gilard, M., Heymans, S., Hoes, A.W., Jaarsma, T., Jankowska, E.A., Lainscak, M., Lam, C.S.P., Lyon, A.R., McMurray, J.J. V, Mebazaa, A., Mindham, R., Muneretto, C., Francesco Piepoli, M., Price, S., Rosano, G.M.C., Ruschitzka, F., Kathrine Skibelund, A., 2021. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: Developed by the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) With the special contributio. *Eur. Heart J.* 42, 3599–3726.
- McMurray, J.J.V., Packer, M., Desai, A.S., Gong, J., Lefkowitz, M.P., Rizkala, A.R., Rouleau, J.L., Shi, V.C., Solomon, S.D., Swedberg, K., Zile, M.R., 2014. Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure. *N. Engl. J. Med.* 371, 993–1004.
- Melenovsky, V., Hwang, S.J., Redfield, M.M., Zakeri, R., Lin, G., Borlaug, B.A., 2015. Left atrial remodeling and function in advanced heart failure with preserved or reduced ejection fraction. *Circ. Hear. Fail.* 8, 295–303.
- Meulemans, A.L., Sipido, K.R., Sys, S.U., Brutsaert, D.L., 1988. Atriopeptin III induces early relaxation of isolated mammalian papillary muscle. *Circ. Res.* 62, 1171–1174.
- Milani-Nejad, N., Brunello, L., Gyorke, S., Janssen, P.M.L., 2014. Decrease in sarcoplasmic reticulum calcium content, not myofilament function, contributes to muscle twitch force decline in isolated cardiac trabeculae. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 35, 225–234.
- Moss, R.L., Fitzsimons, D.P., 2002. Frank-Starling Relationship. *Circ. Res.* 90, 11–13.
- Mosterd, A., Hoes, A.W., 2007. Clinical epidemiology of heart failure. *Heart* 93, 1137–1146.
- Mukoyama, M., Nakao, K., Hosoda, K., Suga, S., Saito, Y., Ogawa, Y., Shirakami, G., Jougasaki, M., Obata, K., Yasue, H., al., et, 1991. Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans. Evidence for an exquisite dual natriuretic peptide system, atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide. *J. Clin. Invest.* 87, 1402–1412.
- Mulieri, L.A., Hasenfuss, G., Ittleman, F., Blanchard, E.M., Alpert, N.R., 1989. Protection of human left ventricular myocardium from cutting injury with 2,3-butanedione monoxime. *Circ. Res.* 65, 1441–1444.
- Mulieri, L.A., Hasenfuss, G., Leavitt, B., Allen, P.D., Alpert, N.R., 1992. Altered myocardial force-frequency relation in human heart failure. *Circulation* 85, 1743–1750.
- Murakami, W., Kobayashi, S., Susa, T., Nanno, T., Ishiguchi, H., Myoren, T., Nishimura, S., Kato, T., Hino, A., Oda, T., Okuda, S., Yamamoto, T., Yano, M., 2016. Recombinant atrial natriuretic peptide prevents aberrant Ca²⁺ leakage through the ryanodine receptor by suppressing mitochondrial reactive oxygen species production induced by isoproterenol in failing cardiomyocytes. *PLoS One* 11, 1–16.
- Nagatsu, T., 2007. The catecholamine system in health and disease -Relation to

6 Quellenverzeichnis

- tyrosine 3-monooxygenase and other catecholamine-synthesizing enzymes. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* 82, 388–415.
- Nakai, J., Ogura, T., Protasi, F., Franzini-Armstrong, C., Allen, P.D., Beam, K.G., 1997. Functional nonequality of the cardiac and skeletal ryanodine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 1019–1022.
- Negrone, J.A., Morotti, S., Lascano, E.C., Gomes, A. V., Grandi, E., Puglisi, J.L., Bers, D.M., 2015. B-Adrenergic Effects on Cardiac Myofilaments and Contraction in an Integrated Rabbit Ventricular Myocyte Model. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 81, 162–175.
- Nir, A., Zhang, D.F., Fixler, R., Burnett, J.C., Eilam, Y., Hasin, Y., 2001. C-type natriuretic peptide has a negative inotropic effect on cardiac myocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 412, 195–201.
- Nuss, H.B., Kääh, S., Kass, D.A., Tomaselli, G.F., Marbán, E., 1999. Cellular basis of ventricular arrhythmias and abnormal automaticity in heart failure. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 277, H80–H91.
- O'Connor, C.M., Starling, R.C., Hernandez, A.F., Armstrong, P.W., Dickstein, K., Hasselblad, V., Heizer, G.M., Komajda, M., Massie, B.M., McMurray, J.J. V., Nieminen, M.S., Reist, C.J., Rouleau, J.L., Swedberg, K., Adams, K.F., Anker, S.D., Atar, D., Battler, A., Botero, R., Bohidar, N.R., Butler, J., Clausell, N., Corbalán, R., Costanzo, M.R., Dahlstrom, U., Deckelbaum, L.I., Diaz, R., Dunlap, M.E., Ezekowitz, J.A., Feldman, D., Felker, G.M., Fonarow, G.C., Gennevois, D., Gottlieb, S.S., Hill, J.A., Hollander, J.E., Howlett, J.G., Hudson, M.P., Kociol, R.D., Krum, H., Laucevicius, A., Levy, W.C., Méndez, G.F., Metra, M., Mittal, S., Oh, B.-H., Pereira, N.L., Ponikowski, P., Tang, W.H.W., Tanomsup, S., Teerlink, J.R., Triposkiadis, F., Troughton, R.W., Voors, A.A., Whellan, D.J., Zannad, F., Califf, R.M., 2011. Effect of Nesiritide in Patients with Acute Decompensated Heart Failure. *N. Engl. J. Med.* 365, 32–43.
- Orchard, C.H., Kentish, J.C., 1990. Effects of changes of pH on the contractile function of cardiac muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 258, C967–C981.
- Packer, M., McMurray, J.J.V., Desai, A.S., Gong, J., Lefkowitz, M.P., Rizkala, A.R., Rouleau, J.L., Shi, V.C., Solomon, S.D., Swedberg, K., Zile, M., Andersen, K., Arango, J.L., Arnold, J.M., Belohlávek, J., Böhm, M., Boytsov, S., Burgess, L.J., Cabrera, W., Calvo, C., Chen, C.H., Dukat, A., Duarte, Y.C., Erglis, A., Fu, M., Gomez, E., González-Medina, A., Hagège, A.A., Huang, J., Katova, T., Kiatchosakun, S., Kim, K.S., Kozan, Ö., Llamas, E.B., Martinez, F., Merkely, B., Mendoza, I., Mosterd, A., Negrusz-Kawecka, M., Peuhkurinen, K., Ramires, F.J.A., Refsgaard, J., Rosenthal, A., Senni, M., Sibulo, A.S., Silva-Cardoso, J., Squire, I.B., Starling, R.C., Teerlink, J.R., Vanhaecke, J., Vinereanu, D., Wong, R.C.C., 2015. Angiotensin receptor neprilysin inhibition compared with enalapril on the risk of clinical progression in surviving patients with heart failure. *Circulation* 131, 54–61.
- Paradise, N.F., Schmitter, J.L., Surmitis, J.M., 1981. Criteria for adequate oxygenation kitten papillary muscle. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 241, 348–353.
- Pavo, I.J., Pavo, N., Kastner, N., Traxler, D., Lukovic, D., Zlabinger, K., Spannauer, A., Riesenhuber, M., Lorant, D., Bartko, P.E., Goliasch, G., Hülsmann, M., Winkler, J., Gyöngyösi, M., 2020. Heart Failure With Reduced Ejection Fraction Is Characterized by Systemic NEP Downregulation. *JACC Basic to Transl. Sci.* 5, 715–726.
- Perera, R.K., Sprenger, J.U., Steinbrecher, J.H., Hübscher, D., Lehnart, S.E.,

6 Quellenverzeichnis

- Abesser, M., Schuh, K., El-Armouche, A., Nikolaev, V.O., 2015. Microdomain switch of cGMP-regulated phosphodiesterases leads to ANP-induced augmentation of β -adrenoceptor-stimulated contractility in early cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* 116, 1304–1311.
- Perreault, C.L., Mulieri, L.A., Alpert, N.R., Ransil, B.J., Allen, P.D., Morgan, J.P., 1992. Cellular basis of negative inotropic effect of 2,3-butanedione monoxime in human myocardium. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 263.
- Pieske, B., Kretschmann, B., Meyer, M., Holubarsch, C., Weirich, J., Posival, H., Minami, K., Just, H., Hasenfuss, G., 1995. Alterations in Intracellular Calcium Handling Associated With the Inverse Force-Frequency Relation in Human Dilated Cardiomyopathy. *Circulation* 92, 1169–1178.
- Pieske, B., Maier, L.S., Piacentino, V., Weisser, J., Hasenfuss, G., Houser, S., 2002. Rate Dependence of $[Na^+]_i$ and Contractility in Nonfailing and Failing Human Myocardium. *Circulation* 106, 447–453.
- Pieske, B., Sütterlin, M., Schmidt-Schweda, S., Minami, K., Meyer, M., Olschewski, M., Holubarsch, C., Just, H., Hasenfuss, G., 1996. Diminished post-rest potentiation of contractile force in human dilated cardiomyopathy. Functional evidence for alterations in intracellular Ca^{2+} handling. *J. Clin. Invest.* 98, 764–776.
- Ponikowski, P., Voors, A.A., Anker, S.D., Bueno, H., Cleland, J.G.F., Coats, A.J.S., Falk, V., González-Juanatey, J.R., Harjola, V.P., Jankowska, E.A., Jessup, M., Linde, C., Nihoyannopoulos, P., Parissis, J.T., Pieske, B., Riley, J.P., Rosano, G.M.C., Ruilope, L.M., Ruschitzka, F., Rutten, F.H., Van Der Meer, P., Sisakian, H.S., Isayev, E., Kurlianskaya, A., Mullens, W., Tokmakova, M., Agathangelou, P., Melenovsky, V., Wiggers, H., Hassanein, M., Uuetoa, T., Lommi, J., Kostovska, E.S., Juilliere, Y., Aladashvili, A., Luchner, A., Chrysohoou, C., Nyolczas, N., Thorgeirsson, G., Weinstein, J.M., Lenarda, A. Di, Aidargaliyeva, N., Bajraktari, G., Beishenkulov, M., Kamzola, G., Abdel-Massih, T., Celutkienė, J., Noppe, S., Cassar, A., Vataman, E., AbirKhalil, S., van Pol, P., Mo, R., Straburzynska-Migaj, E., Fonseca, C., Chioncel, O., Shlyakhto, E., Zavatta, M., Otasevic, P., Goncalvesova, E., Lainscak, M., Molina, B.D., Schaufelberger, M., Suter, T., Yilmaz, M.B., Voronkov, L., Davies, C., 2016. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur. Heart J.* 37, 2129-2200m.
- Potter, L.R., 2011. Natriuretic peptide metabolism, clearance and degradation. *FEBS J.* 278, 1808–1817.
- Potter, L.R., Abbey-Hosch, S., Dickey, D.M., 2006. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr. Rev.* 27, 47–72.
- Primessnig, U., 2011. Funktionelle und arrhythmogene Effekte von Gallensäuren am humanen Vorhofmyokard. Medizinische Universität Graz.
- Primessnig, U., Deißler, P.M., Wakula, P., Tran, K.L., Hohendanner, F., von Lewinski, D., Blaschke, F., Knosalla, C., Falk, V., Pieske, B., Grubitzsch, H., Heinzl, F.R., 2022. Effects of BNP and Sacubitrilat/Valsartan on Atrial Functional Reserve and Arrhythmogenesis in Human Myocardium. *Front. Cardiovasc. Med.*
- Rahimtoola, S.H., Ehsani, A., Sinno, M.Z., Loeb, H.S., Rosen, K.M., Gunnar, R.M., 1975. Left atrial transport function in myocardial infarction. Importance of its booster pump function. *Am. J. Med.* 59, 686–694.
- Rai, A.B.S., Lima, E., Munir, F., Faisal Khan, A., Waqas, A., Bughio, S., Ul Haq, E.,

6 Quellenverzeichnis

- Attique, H. Bin, Rahman, Z.U., 2015. Speckle tracking echocardiography of the right atrium: The neglected chamber. *Clin. Cardiol.* 38, 692–697.
- Ramos, H., de Bold, A.J., 2006. Gene expression, processing, and secretion of natriuretic peptides: physiologic and diagnostic implications. *Heart Fail. Clin.* 2, 255–268.
- Raphael, C., Briscoe, C., Davies, J., Ian Whinnett, Z., Manisty, C., Sutton, R., Mayet, J., Francis, D.P., 2007. Limitations of the New York Heart Association functional classification system and self-reported walking distances in chronic heart failure. *Heart* 93, 476–482.
- Redfield, M.M., Jacobsen, S.J., Burnett, J.C., Mahoney, D.W., Bailey, K.R., Rodeheffer, R.J., 2003. Burden of Systolic and Diastolic Ventricular Dysfunction in the Community. *Jama* 289, 194.
- Richards, A.M., Wittert, G.A., Espiner, E.A., Yandle, T.G., Ikram, H., Frampton, C., 1992. Effect of inhibition of endopeptidase 24.11 on responses to angiotensin II in human volunteers. *Circ. Res.* 71, 1501–1507.
- Ritter, O., Neyses, L., 2003. The molecular basis of myocardial hypertrophy and heart failure. *Trends Mol. Med.* 9, 313–321.
- Roger, V.L., Go, A.S., Lloyd-Jones, D.M., Benjamin, E.J., Berry, J.D., Borden, W.B., Bravata, D.M., Dai, S., Ford, E.S., Fox, C.S., Fullerton, H.J., Gillespie, C., Hailpern, S.M., Heit, J.A., Howard, V.J., Kissela, B.M., Kittner, S.J., Lackland, D.T., Lichtman, J.H., Lisabeth, L.D., Makuc, D.M., Marcus, G.M., Marelli, A., Matchar, D.B., Moy, C.S., Mozaffarian, D., Mussolino, M.E., Nichol, G., Paynter, N.P., Soliman, E.Z., Sorlie, P.D., Sotoodehnia, N., Turan, T.N., Virani, S.S., Wong, N.D., Woo, D., Turner, M.B., 2012. Heart disease and stroke statistics-2012 update: A report from the American heart association. *Circulation* 125, 2–220.
- Rohde, L.E., Chatterjee, N.A., Vaduganathan, M., Claggett, B., Packer, M., Desai, A.S., Zile, M., Rouleau, J., Swedberg, K., Lefkowitz, M., Shi, V., McMurray, J.J. V, Solomon, S.D., 2020. Sacubitril/Valsartan and Sudden Cardiac Death According to Implantable Cardioverter-Defibrillator Use and Heart Failure Cause: A PARADIGM-HF Analysis. *JACC Hear. Fail.* 8, 844–855.
- Ruddox, V., Sandven, I., Munkhaugen, J., Skattebu, J., Edvardsen, T., Otterstad, J.E., 2017. Atrial fibrillation and the risk for myocardial infarction, all-cause mortality and heart failure: A systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Prev. Cardiol.* 24, 1555–1566.
- Ruzicka, M., Leenen, F.H.H., 1999. Relevance of Angiotensin II for Cardiac Hypertrophy and Failure Induced by Cardiac Volume Overload. *Heart Fail. Rev.* 3, 169–181.
- Sackner-Bernstein, J.D., Kowalski, M., Fox, M., Aaronson, K., 2005. Short-term Risk of Death After Treatment With Nesiritide for Decompensated Heart Failure: A Pooled Analysis of Randomized Controlled Trials. *JAMA* 293, 1900–1905.
- Sadoshima, J., Xu, Y., Slayter, H.S., Izumo, S., 1993. Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell* 75, 977–984.
- Sallach, J.A., Tang, W.H.W., Borowski, A.G., Tong, W., Porter, T., Martin, M.G., Jasper, S.E., Shrestha, K., Troughton, R.W., Klein, A.L., 2009. Right Atrial Volume Index in Chronic Systolic Heart Failure and Prognosis. *JACC Cardiovasc. Imaging* 2, 527–534.
- Salvo, G. Di, Caso, P., Piccolo, R. Lo, Fusco, A., Martiniello, A.R., Russo, M.G., Onofrio, A.D., Severino, S., Calabró, P., Pacileo, G., Mininni, N., Calabró, R.,

6 Quellenverzeichnis

2005. Atrial Myocardial Deformation Properties Predict Maintenance of Sinus Rhythm After External Cardioversion of Recent-Onset Lone Atrial Fibrillation A Color Doppler Myocardial Imaging and Transthoracic and Transesophageal Echocardiographic Study.
- Santos, R.A.S., Oudit, G.Y., Verano-Braga, T., Canta, G., Steckelings, U.M., Bader, M., 2019. The renin-angiotensin system: going beyond the classical paradigms. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 316, H958–H970.
- Sardana, M., Syed, A.A., Hashmath, Z., Phan, T.S., Koppula, M.R., Kewan, U., Ahmed, Z., Chandamuri, R., Varakantam, S., Shah, E., Gorz, R., Akers, S.R., Chirinos, J.A., 2017. Beta-blocker use is associated with impaired left atrial function in hypertension. *J. Am. Heart Assoc.* 6, 1–10.
- Sartoretto, J.L., Jin, B.Y., Bauer, M., Gertler, F.B., Liao, R., Michel, T., 2009. Regulation of VASP phosphorylation in cardiac myocytes: differential regulation by cyclic nucleotides and modulation of protein expression in diabetic and hypertrophic heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 297, H1697–H1710.
- Schiebinger, R.J., Greening, K.M., 1992. Interaction between stretch and hormonally stimulated atrial natriuretic peptide secretion. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 262, H78–H83.
- Schiering, N., D'Arcy, A., Villard, F., Ramage, P., Logel, C., Cumin, F., Ksander, G.M., Wiesmann, C., Karki, R.G., Mogi, M., 2016. Structure of neprilysin in complex with the active metabolite of sacubitril. *Sci. Rep.* 6, 27909.
- Schnabel, R.B., Johannsen, S.S., Wild, P.S., Blankenberg, S., 2015. Prävalenz und Risikofaktoren von Vorhofflimmern in Deutschland. *Herz* 40, 8–15.
- Schneider, C., Malisius, R., Krause, K., Lampe, F., Bahlmann, E., Boczor, S., Antz, M., Ernst, S., Kuck, K., 2008. Strain rate imaging for functional quantification of the left atrium : atrial deformation predicts the maintenance of sinus rhythm after catheter ablation of atrial fibrillation 49, 1397–1409.
- Schotten, U., Greiser, M., Benke, D., Buerkel, K., Ehrenteidt, B., Stellbrink, C., Vazquez-Jimenez, J.F., Schoendube, F., Hanrath, P., Allessie, M., 2002. Atrial fibrillation-induced atrial contractile dysfunction: A tachycardiomyopathy of a different sort. *Cardiovasc. Res.* 53, 192–201.
- Schuijt, M.P., Danser, A.H.J., 2002. Cardiac angiotensin II: an intracrine hormone? *Am. J. Hypertens.* 15, 1109–1116.
- Schwinger, R.H., Böhm, M., Koch, A., Schmidt, U., Morano, I., Eissner, H.J., Überfuhr, P., Reichart, B., Erdmann, E., 1994. The failing human heart is unable to use the Frank-Starling mechanism. *Circ. Res.* 74, 959–969.
- Schwinger, R.H., Böhm, M., Pieske, B., Erdmann, E., 1991. Different beta-adrenoceptor-effector coupling in human ventricular and atrial myocardium. *Eur. J. Clin. Invest.* 21, 443–451.
- Schwinger, Robert H.G., Böhm, M., Koch, A., Uhlmann, R., Überfuhr, P., Kreuzer, E., Reichart, B., Erdmann, E., 1993. Force-frequency-relation in human atrial and ventricular myocardium. *Mol. Cell. Biochem.* 119, 73–78.
- Schwinger, Robert H G, Böhm, M., Koch, A., Uhlmann, R., Überfuhr, P., Kreuzer, E., Reichart, B., Erdmann, E., 1993. Force-frequency-relation in human atrial and ventricular myocardium. *Mol. Cell. Biochem.* 119, 73–78.
- Semenov, A.G., Tamm, N.N., Seferian, K.R., Postnikov, A.B., Karpova, N.S., Serebryanaya, D. V, Koshkina, E. V, Krasnoselsky, M.I., Katrukha, A.G., 2010. Processing of pro-B-type natriuretic peptide: furin and corin as candidate convertases. *Clin. Chem.* 56, 1166–1176.
- Shi, J., Wang, X., Nguyen, J., Wu, A.H., Bleske, B.E., Zhu, H.J., 2016. Sacubitril is

6 Quellenverzeichnis

- selectively activated by carboxylesterase 1 (CES1) in the liver and the activation is affected by CES1 genetic variation. *Drug Metab. Dispos.* 44, 554–559.
- Sigma-Aldrich, 2020. HEPES (product information) [WWW Document]. URL <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/SIGMA/H3375?lang=de®ion=DE> (accessed 4.10.20).
- Solomon, S.D., McMurray, J.J.V., Anand, I.S., Ge, J., Lam, C.S.P., Maggioni, A.P., Martinez, F., Packer, M., Pfeffer, M.A., Pieske, B., Redfield, M.M., Rouleau, J.L., Van Veldhuisen, D.J., Zannad, F., Zile, M.R., Desai, A.S., Claggett, B., Jhund, P.S., Boytsov, S.A., Comin-Colet, J., Cleland, J., Düngen, H.D., Goncalvesova, E., Katova, T., Kerr Saraiva, J.F., Lelonek, M., Merkely, B., Senni, M., Shah, S.J., Zhou, J., Rizkala, A.R., Gong, J., Shi, V.C., Lefkowitz, M.P., 2019. Angiotensin–neprilysin inhibition in heart failure with preserved ejection fraction. *N. Engl. J. Med.* 381, 1609–1620.
- Solomon, S.D., McMurray, J.J. V, Claggett, B., de Boer, R.A., DeMets, D., Hernandez, A.F., Inzucchi, S.E., Kosiborod, M.N., Lam, C.S.P., Martinez, F., Shah, S.J., Desai, A.S., Jhund, P.S., Belohlavek, J., Chiang, C.-E., Borleffs, C.J.W., Comin-Colet, J., Dobreanu, D., Drozd, J., Fang, J.C., Alcocer-Gamba, M.A., Al Habeeb, W., Han, Y., Cabrera Honorio, J.W., Janssens, S.P., Katova, T., Kitakaze, M., Merkely, B., O’Meara, E., Saraiva, J.F.K., Tereshchenko, S.N., Thierer, J., Vaduganathan, M., Vardeny, O., Verma, S., Pham, V.N., Wilderäng, U., Zaozerska, N., Bachus, E., Lindholm, D., Petersson, M., Langkilde, A.M., 2022. Dapagliflozin in Heart Failure with Mildly Reduced or Preserved Ejection Fraction. *N. Engl. J. Med.* 387, 1089–1098.
- Soulat-dufour, L., Addetia, K., Miyoshi, T., Citro, R., Daimon, M., Fajardo, P.G., Kasliwal, R.R., Kirkpatrick, J.N., Monaghan, M.J., Muraru, D., Ogunyankin, K.O., Park, S.W., Ronderos, R.E., Sadeghpour, A., Scalia, G.M., Takeuchi, M., Tsang, W., Tucay, E.S., Clara, A., Rodrigues, T., Vivekanandan, A., Zhang, Y., Diehl, M., Schreckenber, M., Mor-avi, V., Asch, F.M., Lang, R.M., Investigators, W., 2020. Normal Values of Right Atrial Size and Function According to Age, Sex and Ethnicities: Results of the World Alliance of Societies of Echocardiography Study. *J. Am. Soc. Echocardiogr.*
- Sparks, M.A., Crowley, S.D., Gurley, S.B., Mirotso, M., Coffman, T.M., 2014. Classical Renin-Angiotensin system in kidney physiology. *Compr. Physiol.* 4, 1201–1228.
- Spencer, K.T., Iii, J.G., Demaria, A.N., Kimball, T.R., Monaghan, M.J., Perez, J.E., Weinert, L., Bednarz, J., Edelman, K., Kwan, O.L., Glascock, B., Hancock, J., Baumann, C., Lang, R.M., 2001. Effects of aging on left atrial reservoir , conduit , and booster pump function : a multi-institution acoustic quantification study. *Heart* 85, 272–277.
- Spertus, J.A., Jones, P.G., Sandhu, A.T., Suzanne, V.A., 2020. Interpreting the Kansas City. *J. Am. Coll. Cardiol.* 76, 2379–2390.
- Stewart, S., Jenkins, A., Buchan, S., McGuire, A., Capewell, S., McMurray, J.J.J. V, 2002. The current cost of heart failure to the National Health Service in the UK. *Eur. J. Heart Fail.* 4, 361–371.
- Sudoh, T., Kangawa, K., Minamino, N., Matsuo, H., 1988. A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* 332, 78–81.
- Sudoh, T., Minamino, N., Kangawa, K., Matsuo, H., 1990. C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168, 863–870.
- Suo, Y., Yuan, M., Li, H., Zhang, Y., Li, Y., Fu, H., Han, F., Ma, C., Wang, Y., Bao,

6 Quellenverzeichnis

- Q., Li, G., 2019. Sacubitril/valsartan improves left atrial and left atrial appendage function in patients with atrial fibrillation and in pressure overload-induced mice. *Front. Pharmacol.* 10, 1–11.
- Sutanto, H., Dobrev, D., Heijman, J., 2021. Angiotensin Receptor-Nepriylsin Inhibitor (ARNI) and Cardiac Arrhythmias. *Int. J. Mol. Sci.* .
- Szczepanska-Sadowska, E., Czarzasta, K., Cudnoch-Jedrzejewska, A., 2018. Dysregulation of the Renin-Angiotensin System and the Vasopressinergic System Interactions in Cardiovascular Disorders. *Curr. Hypertens. Rep.* 20, 19.
- Taylor, D.G., Parilak, L.D., LeWinter, M.M., Knot, H.J., 2004. Quantification of the rat left ventricle force and Ca²⁺ -frequency relationships: similarities to dog and human. *Cardiovasc. Res.* 61, 77–86.
- Topol, E.J., 2005. Nesiritide — Not Verified. *N. Engl. J. Med.* 353, 113–116.
- Tsang, T.S.M., Barnes, M.E., Ms, C., Gersh, B.J., Hil, D.P., Takemoto, Y., Rosales, A.G., Bailey, K.R., Seward, J.B., 2003. Prediction of Risk for First Age-Related Cardiovascular Events in an Elderly Population : The Incremental Value of Echocardiography. *J. Am. Coll. Cardiol.* 42, 1199–1205.
- Tschöpe, C., Spillmann, F., Altmann, C., Koch, M., Westermann, D., Dhayat, N., Dhayat, S., Bascands, J.-L., Gera, L., Hoffmann, S., Schultheiss, H.-P., Walther, T., 2004. The bradykinin B1 receptor contributes to the cardioprotective effects of AT1 blockade after experimental myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* 61, 559–569.
- Turner, A.J., Isaac, R.E., Coates, D., 2001. The neprilysin (NEP) family of zinc metalloendopeptidases : genomics and function. *BioEssays* 23, 261–269.
- Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B.M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, Å., Kampf, C., Sjöstedt, E., Asplund, A., Olsson, I., Edlund, K., Lundberg, E., Navani, S., Szigyanto, C.A.-K., Odeberg, J., Djureinovic, D., Takanen, J.O., Hober, S., Alm, T., Edqvist, P.-H., Berling, H., Tegel, H., Mulder, J., Rockberg, J., Nilsson, P., Schwenk, J.M., Hamsten, M., von Feilitzen, K., Forsberg, M., Persson, L., Johansson, F., Zwahlen, M., von Heijne, G., Nielsen, J., Pontén, F., 2015. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* 347, 1260419.
- van Heerebeek, L., Borbély, A., Niessen, H.W.M., Bronzwaer, J.G.F., van der Velden, J., Stienen, G.J.M., Linke, W.A., Laarman, G.J., Paulus, W.J., 2006. Myocardial structure and function differ in systolic and diastolic heart failure. *Circulation* 113, 1966–1973.
- Verbrugge, F.H., Guazzi, M., Testani, J.M., Borlaug, B.A., 2020. Altered Hemodynamics and End-Organ Damage in Heart Failure. *Circulation* 142, 998–1012.
- Verheijen, M., Lienhard, M., Schrooders, Y., Clayton, O., Nudischer, R., Boerno, S., Timmermann, B., Selevsek, N., Schlapbach, R., Gmuender, H., Gotta, S., Geraedts, J., Herwig, R., Kleinjans, J., Caiment, F., 2019. DMSO induces drastic changes in human cellular processes and epigenetic landscape in vitro. *Sci. Rep.* 9, 1–12.
- Voigt, N., Zhou, X.B., Dobrev, D., 2013. Isolation of human atrial myocytes for simultaneous measurements of Ca²⁺ transients and membrane currents. *J. Vis. Exp.* 1–9.
- von Lewinski, D., Kockskämper, J., Rüberrus, S.U., Zhu, D., Schmitto, J.D., Schöndube, F.A., Hasenfuss, G., Pieske, B., 2008. Direct pro-arrhythmogenic effects of angiotensin II can be suppressed by AT1 receptor blockade in human atrial myocardium. *Eur. J. Heart Fail.* 10, 1172–1176.

6 Quellenverzeichnis

- Von Lewinski, D., Stumme, B., Fialka, F., Luers, C., Pieske, B., 2004. Functional relevance of the stretch-dependent slow force response in failing human myocardium. *Circ. Res.* 94, 1392–1398.
- Wachter, R., Schmidt-Schweda, S., Westermann, D., Post, H., Edelmann, F., Kasner, M., Lüers, C., Steendijk, P., Hasenfuss, G., Tschöpe, C., Pieske, B., 2009. Blunted frequency-dependent upregulation of cardiac output is related to impaired relaxation in diastolic heart failure. *Eur. Heart J.* 30, 3027–3036.
- Wakayama, Y., Miura, M., Stuyvers, B.D., Boyden, P.A., Ter Keurs, H.E.D.J., 2005. Spatial nonuniformity of excitation-contraction coupling causes arrhythmogenic Ca²⁺ waves in rat cardiac muscle. *Circ. Res.* 96, 1266–1273.
- Wang, S.Q., Song, L.S., Lakatta, E.G., Cheng, H., 2001. Ca²⁺ signalling between single L-type Ca²⁺ channels and ryanodine receptors in heart cells. *Nature* 410, 592–596.
- Wang, T.J., Larson, M.G., Levy, D., Vasan, R.S., Leip, E.P., Wolf, P.A., D’Agostino, R.B., Murabito, J.M., Kannel, W.B., Benjamin, E.J., 2003. Temporal relations of atrial fibrillation and congestive heart failure and their joint influence on mortality: the Framingham Heart Study. *Circulation* 107, 2920–2925.
- Wang, Z., Taylor, L.K., Denney, W.D., Hansen, D.E., 1994. Initiation of ventricular extrasystoles by myocardial stretch in chronically dilated and failing canine left ventricle. *Circulation* 90, 2022–2031.
- Watanabe, Y., Iwamoto, T., Matsuoka, I., Ohkubo, S., Ono, T., Watano, T., Shigekawa, M., Kimura, J., 2001. Inhibitory effect of 2,3-butanedione monoxime (BDM) on Na⁺/Ca²⁺ exchange current in guinea-pig cardiac ventricular myocytes. *Br. J. Pharmacol.* 132, 1317–1325.
- Wen, Y., Deißler, P.M., Primeßnig, U., Dushe, S., Falk, V., Parwani, A.S., Boldt, L.-H., Blaschke, F., Knosalla, C., Grubitzsch, H., Pieske, B.M., Heinzl, F.R., 2021. Impaired Relaxation and Reduced Lusitropic Reserve in Atrial Myocardium in the Obese Patients. *Front. Cardiovasc. Med.*
- Yamanaka, T., Onishi, K., Tanabe, M., Dohi, K., Funabiki-Yamanaka, K., Fujimoto, N., Kurita, T., Tanigawa, T., Kitamura, T., Ito, M., Nobori, T., Nakano, T., 2006. Force- and relaxation-frequency relations in patients with diastolic heart failure. *Am. Heart J.* 152, 966.e1–7.
- Yamasaki, R., Wu, Y., McNabb, M., Greaser, M., Labeit, S., Granzier, H., 2002. Protein kinase A phosphorylates titin’s cardiac-specific N2B domain and reduces passive tension in rat cardiac myocytes. *Circ. Res.* 90, 1181–1188.
- Yap, J., Lim, F.Y., Gao, F., Teo, L.L., Lam, C.S.P., Yeo, K.K., 2015. Correlation of the New York Heart Association Classification and the 6-Minute Walk Distance: A Systematic Review. *Clin. Cardiol.* 38, 621–628.
- Zaccolo, M., Movsesian, M.A., 2007. cAMP and cGMP signaling cross-talk: Role of phosphodiesterases and implications for cardiac pathophysiology. *Circ. Res.* 100, 1569–1578.
- Zoni-Berisso, M., Lercari, F., Carazza, T., Domenicucci, S., 2014. Epidemiology of atrial fibrillation: European perspective. *Clin. Epidemiol.* 6, 213–220.

IV. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Peter Maximilian Deißler, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **„Einfluss von BNP und LBQ657 + Valsartan auf die atriale in-vitro Funktion in humanem Myokard“** (Effects of BNP and LBQ657 + Valsartan on Atrial in-vitro Function in Human Myocardium) selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Datum

Unterschrift

V. Publikationsliste mit Anteilserklärung

V.1 Publikationen in Peer-Reviewed Journalen

Wen, Y., **Deißler, P.M.**, Primeßnig, U., Dushe, S., Falk, V., Parwani, A.S., Boldt, L.-H., Blaschke, F., Knosalla, C., Grubitzsch, H., Pieske, B.M., Heinzl, F.R., **2021**. Impaired Relaxation and Reduced Lusitropic Reserve in Atrial Myocardium in the Obese Patients. Front. Cardiovasc. Med.

Beitrag im Einzelnen: Etablierung und Durchführung der funktionellen Messungen und Aufbereitung der Daten zur weiteren Analyse, Erstellung der Abbildung S2 (Online Supplement), Korrektur des Manuskripts, Anpassung des Manuskripts im Rahmen der Revision.

Primessnig, U.*, **Deißler, P.M.***, Wakula, P., Tran, K. L., Hohendanner, F., von Lewinski, D., Blaschke, F., Knosalla, C., Falk, V., Pieske, B., Grubitzsch, H., Heinzl, F.R., **2022**. Effects of BNP and Sacubitrilat/Valsartan on atrial functional reserve and arrhythmogenesis in human myocardium. Front. Cardiovasc. Med.

*geteilte Erstautorenschaft

Beitrag im Einzelnen: Etablierung und Durchführung der funktionellen Messungen, in Teilen: Durchführung der statistischen Analysen, in Teilen: Interpretation der Ergebnisse, Erstellung der Abbildungen der Publikation (Figures 1-4 und Supplement Figures 1-4), Erstellung der Tabellen der Publikation (Tabelle 1 und Supplement Tabelle 1), in Teilen: Verfassen des Manuskripts und des Abstracts.

V.2 Kongressbeiträge

6th Young DZHK Retreat – 11-12.09.2019

Deißler, P.M., Primessnig, U., Hohendanner, F., Grubitzsch, H., Falk, V., Pieske, B., Heinzl, F.R., **2019**. Effects of Brain Natriuretic Peptide (BNP) on atrial inotropy and lusitropy: In-vitro assessment in human myocardium, yDZHK Retreat 2019

Beitrag im Einzelnen: Durchführung der funktionellen Messungen, in Teilen: Durchführung der statistischen Analysen, in Teilen: Interpretation der Ergebnisse, Vorbereitung des Abstracts und des Posters (inkl. Abbildungen), Präsentation des Posters.

DGK Herztage 2019 – 10-12.10.2019

Primessnig, U., **Deissler, P.**, Hohendanner, F., Grubitzsch, H., Falk, V., Pieske, B., Heinzel, F.R., **2019**. BS287 - Effects of Brain Natriuretic Peptide (BNP) on atrial inotropy and lusitropy in human multicellular myocardium. Clin Res Cardiol. 108, Suppl 2.

Beitrag im Einzelnen: Durchführung der funktionellen Messungen, Anteil an der Durchführung der statistischen Analysen, Anteil an der Interpretation der Ergebnisse.

DGK Jahrestagung und Herztage 2020 – 14-17.10.2020

Deissler, P.M., Primessnig, U., Hohendanner, F., Grubitzsch, H., von Lewinski, D., Falk, V., Pieske, B., Heinzel, F.R., **2020**. P862 - The Effect of Brain Natriuretic Peptide (BNP) on diastolic force adaptation to cardiac stress: In-vitro Assessment in Human Myocardium. Clin Res Cardiol. 109, Suppl 1.

Beitrag im Einzelnen: Durchführung der funktionellen Messungen, in Teilen: Durchführung der statistischen Analysen, in Teilen: Interpretation der Ergebnisse, Vorbereitung des Abstracts und des Posters (incl. Abbildungen), Präsentation des Posters (aufgrund der COVID-19 Pandemie) ausgefallen.

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

VI. Lebenslauf

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

VII. Danksagung

An erster Stelle gilt mein herzlicher Dank Herrn **Prof. Dr. Dr. Frank Heinzl** für die Überlassung des spannenden Themas und seine Förderung in den letzten Jahren. Die Arbeit an verschiedenen von ihm geleiteten Projekten hat mein Interesse an der translationalen kardiologischen Forschung geweckt, welches mich auch in Zukunft weiter begleiten wird. Durch seine Betreuung und sein Engagement hat er mir zudem viele Möglichkeiten zur persönlichen und fachlichen Weiterentwicklung eröffnet.

Herrn **Dr. Uwe Primessnig** danke für die direkte Betreuung und die enge Zusammenarbeit während den Versuchsphasen, sowie für die methodische Einführung in die Muskelstreifen-Experimente. Ebenso möchte ich Herrn **PD Dr. Felix Hohendanner** für die Hilfe bei der Patient:innen-Rekrutierung danken. Frau **Dr. Paulina Wakula-Heinzl** danke ich für ihre Unterstützung bei den molekularbiologischen Untersuchungen.

Herrn **Dr. Jan Eckhardt** danke ich vielmals für die Hilfe bei dem Aufbau der Messstationen in Berlin und für den vielfachen telefonischen Rat bei Fehlfunktionen oder Schwierigkeiten mit den Messprogrammen.

I furthermore want to sincerely thank Mr. **Brian Danzer** for his help during the experimental phase of this project. I really appreciated his engagement and him always being there to jump in and support the experiments if needed and to troubleshoot whatever didn't work.

Bei all meinen **Mitdotorand:innen** möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit in den letzten Jahren bedanken.

Der **Herzchirurgie am Standort Virchow Klinikum und am DHZB**, namentlich Herrn Prof. Dr. Falk, Herrn Prof. Dr. Knosalla, Herrn PD Dr. Grubitzsch, Herrn Dr. Dushe, Herrn PD Dr. Holinski, Herrn PD Dr. Christ und Herrn PD Dr. Sündermann sowie allen OP-Pflegekräften danke ich herzlich für die Bereitstellung der Myokardproben.

Dem **DZHK Standort Berlin** danke ich für die finanzielle Förderung im Rahmen des DZHK Promotionsstipendiums für Medizinstudierende (2019-2020), sowie der **Studienstiftung des deutschen Volkes** für die finanzielle und ideelle Förderung (2017-2022).

Meinen **Eltern und Großeltern** danke ich von Herzen für all ihren Einsatz, ihre Geduld und ihre andauernde Unterstützung. Ohne euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Bei meinen **Freunden in Berlin und Freiburg** möchte ich mich ebenfalls für ihre Unterstützung in den letzten Jahren bedanken. Mit dieser Arbeit geht auch meine Studienzeit zu Ende, die von euch allen bereichert wurde. Schließlich danke ich meiner Freundin **Annika** für ihr Verständnis, ihre Hilfe und ihr Lektorat während dieser Arbeit.

Mein tiefer Dank gilt allen Patient:innen für ihre Einwilligung zur Teilnahme an dieser Studie. Sie haben die hier dargelegte Forschung erst ermöglicht und mit ihrer Bereitschaft einen großen Beitrag zum Gelingen der Arbeit geleistet.

VIII. Bescheinigung des akkreditierten Statistikers



CharitéCentrum für Human- und Gesundheitswissenschaften

Charité | Campus Charité Mitte | 10117 Berlin

Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBikE)

Direktor: Prof. Dr. Geraldine Rauch

Name, Vorname: Deißler, Peter Maximilian
Emailadresse: peter-maximilian.deissler@charite.de
Matrikelnummer: 221309
PromotionsbetreuerIn: Professor Frank Heinzel
Promotionsinstitution / Klinik: Kardiologie

Postanschrift:
Charitéplatz 1 | 10117 Berlin
Besucheranschrift:
Reinhardtstr. 58 | 10117 Berlin

Tel. +49 (0)30 450 562171
geraldine.rauch@charite.de
<https://biometrie.charite.de/>



Bescheinigung

Hiermit bescheinige ich, dass Herr *Peter Maximilian Deißler* innerhalb der Service Unit Biometrie des Instituts für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBikE) bei mir eine statistische Beratung zu einem Promotionsvorhaben wahrgenommen hat. Folgende Beratungstermine wurden wahrgenommen:

- Termin 1: 0.1.12.2020
- Termin 2: 10.11.2021

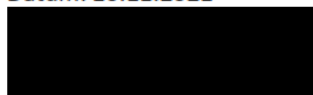
Folgende wesentliche Ratschläge hinsichtlich einer sinnvollen Auswertung und Interpretation der Daten wurden während der Beratung erteilt:

- Statistische Abhängigkeit beachten
- Repeated Measures ANOVA (Split-Plot Plan)
- Grafische Darstellungen

Diese Bescheinigung garantiert nicht die richtige Umsetzung der in der Beratung gemachten Vorschläge, die korrekte Durchführung der empfohlenen statistischen Verfahren und die richtige Darstellung und Interpretation der Ergebnisse. Die Verantwortung hierfür obliegt allein dem Promovierenden. Das Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie übernimmt hierfür keine Haftung.

Datum: 10.11.2021

Name des Beraters: Frank Konietschke



Prof. Dr. rer. nat. Frank Konietschke


UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN
Institut für Biometrie und
Klinische Epidemiologie
Prof. Dr. Frank Konietschke
Campus Charité Mitte
Charitéplatz 1 | D-10117 Berlin
Besucheranschrift: Reinhardtstraße 58

Unterschrift BeraterIn, Institutsstempel