

# DISSERTATION

Kardiovaskuläre Effekte eines maternalen Peptid-Antagonisten  
gegen den Angiotensin-II Typ-1 Rezeptor bei Ratten mit  
Präeklampsie

Cardiovascular effects of a maternal peptide antagonist against  
the angiotensin II type-1 receptor in rats with preeclampsia

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
Yasmin Esmati  
Aus Berlin, Deutschland

Erstbetreuung: Prof. Dr. Ralf Dechend

Datum der Promotion: 30.06.2024

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	4
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	5
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	6
<b>Zusammenfassung</b> .....	10
<b>Abstract</b> .....	11
<b>1. Einleitung</b> .....	12
1.1. Allgemein .....	12
1.2. Epidemiologie und Ätiologie .....	13
1.3. Pathogenese .....	13
1.3.1. Plazentationsstörung.....	13
1.3.2. Vasoaktive Mediatoren.....	15
1.4. Renin-Angiotensin-Aldosteron-System .....	17
1.4.1. RAAS und normale Schwangerschaft .....	17
1.4.2. RAAS und Präeklampsie.....	18
1.5. Kardiovaskuläres Langzeit-Risiko .....	20
1.6. Therapie der Präeklampsie .....	21
1.7. Peptide – neues therapeutisches Target? .....	22
1.8. Transgenes Tiermodell .....	23
<b>2. Zielsetzung</b> .....	26
<b>3. Material</b> .....	26
3.1. Antikörper und Kits.....	26
3.2. Reagenzien und Chemikalien .....	27
3.2.1 RNA-Isolation und PCR .....	27
3.2.2. Immunhistochemie .....	27
3.3. Geräte und Software.....	28
3.4. Verbrauchsmaterialien .....	29
<b>4. Methoden</b> .....	29
4.1. Versuchstiere und Studiendesign .....	29
4.2. Blutabnahme.....	32
4.3. Ultraschall .....	32
4.4. Immunhistochemie .....	34
4.5. Gewebeanalyse mittels qPCR .....	36
4.5.1. RNA-Isolierung.....	37

4.5.2. Umschreibung (RNA zu cDNA) .....	38
4.5.3. qPCR.....	38
4.5.4. Primerdesign und Herstellung .....	41
4.5.5. Analyse der Genexpressionsmessung.....	42
4.6. Proteinnachweis mittels ELISA .....	43
4.7. Statistik .....	44
<b>5. Ergebnisse</b> .....	<b>44</b>
5.1. Telemetrie .....	45
5.2. Basisparameter .....	49
5.3. Echokardiographische Parameter .....	50
5.4. Speckle-Tracking Echokardiographie .....	52
5.5. Gewebedopplerparameter .....	57
5.6. Immunhistologische Ergebnisse .....	59
5.7. Genexpressionsanalyse und ELISA.....	62
<b>6. Diskussion</b> .....	<b>67</b>
6.1. Therapeutische Effekte des Peptid-Antagonisten auf das Herz ....	67
6.2. RAS-Inhibitoren und Peptid-Antagonisten als potenzieller Therapieansatz .....	72
<b>7. Perspektive und Limitationen</b> .....	<b>74</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>78</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung</b> .....	<b>88</b>
<b>Lebenslauf</b> .....	<b>89</b>
<b>Komplette Publikationsliste</b> .....	<b>91</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>92</b>
<b>Bescheinigung des akkreditierten Statistikers</b> .....	<b>93</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 – Definition der PE .....	12
Abb. 2 – Normale und gestörte Plazentation bei der Präeklampsie.....	14
Abb. 3 – VEGF-Rezeptoren .....	15
Abb. 4 – Versuchsaufbau.....	25
Abb. 5 – Durchführung der Tierstudie.....	32
Abb. 6 – Mittlere arterielle Blutdruck (MAP), systolische Blutdruck (SBP) und diastolische Blutdruck (DBP) .....	46
Abb. 7 – Basisparameter: Körpergewicht, Herzzeitvolumen und Herzfrequenz .....	49
Abb. 8 – Echokardiographische Parameter (1): Schlagvolumen, enddiastolisches und endsystolisches Volumen .....	50
Abb. 9 – Echokardiographische Parameter (2): linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser systolisch und diastolisch.....	51
Abb. 10 – Speckle-Tracking Echokardiographie: Ejektionsfraktion und globaler longitudinaler Strain .....	52
Abb. 11 – Speckle-Tracking-Echokardiographie: regionale Analyse (longitudinaler Strain und longitudinale Strain-Rate) .....	53
Abb. 12 – Spiderplot: Vergleich von Basisparameter und echokardiographischen Parametern zwischen PE und PE + Peptid Tieren .....	55
Abb. 13 – Gewebedopplerparameter .....	57
Abb. 14 – Quantitative Proteinanalyse mittels immunohistologischer Färbungen.....	59
Abb. 15 – ED1 Färbung zur Analyse inflammatorischer Vorgänge im linken Ventrikel.....	61
Abb. 16 – Genexpressionsanalyse von den Immunmarkern <i>Mcp-1</i> und <i>Cd68</i> .....	62
Abb. 17 – Genexpressionsanalyse von <i>Anp/Bnp</i> .....	63
Abb. 18 – Genexpressionsanalyse von <i>Myh6</i> und <i>Myh7</i> .....	64
Abb. 19 – Genexpression von Fibrosemarkern .....	65
Abb. 20 – Heatmap veränderter Markerene.....	65
Abb. 21 – Regionenspezifische Genexpression des Herzens .....	71
Abb. 22 – funktionelle und strukturelle Veränderungen des Herzens bei PE.....	74

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1 – Nummer und Herstellerangaben der Antikörper für die Immunhistochemie .....	26
Tab. 2 – Herstellerangaben zu den Kits für die Genexpressionsanalyse und den ELISA.....	27
Tab. 3 – Nummer und Hersteller der Reagenzien und Chemikalien für die Genexpressionsanalyse .....	27
Tab. 4 – Nummer und Hersteller der Reagenzien und Chemikalien für die Immunhistochemie .....	27
Tab. 5 – Herstellerangaben der verwendeten Geräte .....	28
Tab. 6 – Herstellerangaben der Softwares für die Datenanalyse .....	28
Tab. 7 – Herstellerangaben der Verbrauchsmaterialien.....	29
Tab. 8 – Verdünnungsprotokoll der primären und sekundären Antikörper für die Immunhistochemie .....	35
Tab. 9 – Zusammensetzung des Mastermix für die Reverse Transkription.....	38
Tab. 10 – Zusammensetzung des Mastermix für die RT-qPCR (TaqMan oder SYBR Green Methode).....	40
Tab. 11 – PCR-Protokoll.....	40
Tab. 12 – Primer- und Sondensequenzen .....	41
Tab. 13 – Telemetrie: mittlere arterielle Blutdruck (Tag 1 – 20) .....	46
Tab. 14 – Telemetrie: systolische arterielle Blutdruck (Tag 1 – 20).....	47
Tab. 15 – Telemetrie: diastolische arterielle Blutdruck (Tag 1 – 20) .....	48
Tab. 16 – Speckle-Tracking-Echokardiographie: Longitudinaler Strain.....	54
Tab. 17 – Speckle-Tracking-Echokardiographie: Longitudinale Strain-Rate .....	55
Tab. 18 – Basisparameter und echokardiographische Parameter .....	56
Tab. 19 – Gewebedopplerparameter .....	58
Tab. 20 – Genexpressionsanalyse der spezifischen Markergene.....	66

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
36B4	Saures ribosomales Phosphoprotein P0 ( <i>ribosomal protein lateral stalk subunit P0</i> )
A	Desoxyadenosintriphosphat
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-konvertierende Enzym ( <i>angiotensin-converting-enzyme</i> )
Ang II	Angiotensin II
ANP	atriales natriuretisches Peptid ( <i>atrial natriuretic peptide</i> )
AO	Aorta
AoV	Aortenklappe
AT1-R	Angiotensin II Typ-1 Rezeptor
AT1-R AA	Angiotensin 1 – Rezeptor Autoantikörper
a.u.	Arbitrary units (willkürliche Einheiten)
BK B2-R	Bradykinin B2-Rezeptor
BNP	natriuretischen Peptides Typ B ( <i>brain natriuretic peptide</i> )
C	Desoxycytosintriphosphat
CD68	Differenzierungscluster 68 ( <i>cluster of differentiation 68</i> )
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Col1	Kollagen Typ 1 ( <i>collagen type 1</i> )
CTGF	Bindegewebs-Wachstumsfaktor ( <i>connective tissue growth factor</i> )
Ct-Wert	Schwellenwertzyklus ( <i>cycle threshold</i> )
d	Tag
-d12	12 Tage vor der Befruchtung
d21	Tag 21
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH <sub>2</sub> O	demineralisiertes Wasser ( <i>double-distilled water</i> )
DIC	Disseminierte intravasale Koagulopathie

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
dsDNA	doppelsträngige DNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure ( <i>Ethylendiamintetraacetat</i> )
EF	Ejektionsfraktion
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FAM	6-Carboxy-Fluoreszein
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
Fn	Fibronektin ( <i>fibronectin</i> )
g	Gramm
G	Desoxyguanosintriphosphat
GLS	Globaler longitudinaler Strain
H <sub>2</sub> O	Wasser
hAogen	humanes Angiotensinogen
HELLP	Hämolytische Anämie, erhöhte Leberwerte, Thrombozytopenie ( <i>H</i> aemolysis, <i>E</i> levated <i>L</i> iver enzymes, <i>L</i> ow <i>P</i> latelet count)
hRen	humane Renin
IgG	Immunglobulin G
IUGR	Intrauterine Wachstumsrestriktion ( <i>intrauterine growth restriction</i> )
Kg	Kilogramm
LA	Linker Vorhof (left atrium)
LV	Linksventrikulär; linker Ventrikel
M	Molar
MCP-1	monozytenchemotaktischen Protein-1 ( <i>monocyte chemoattractant protein-1</i> )
MDC	Max-Delbrück Zentrum für Molekulare Medizin
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
MV	Mitralklappe
Myh 6	Gen für Myosin 'schwere Kette' $\alpha$ ( <i>myosin heavy chain <math>\alpha</math></i> )
Myh 7	Gen für Myosin 'schwere Kette' $\beta$ ( <i>myosin heavy chain <math>\beta</math></i> )

n	Stichprobenumfang
NDS	Esenserum ( <i>normal donkey serum</i> )
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
p	p-Wert
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
pH	Gegenzahl des dekadischen Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PE	Präeklampsie
PlGF	plazentarer Wachstumsfaktor ( <i>placental growth factor</i> )
r	Radius
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
pp	postpartum
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	quantitative Echtzeit-PCR (real time quantitative PCR)
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
RAS	Renin-Angiotensin-System
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehung pro Minute (rounds per minute)
RVOT	Rechtsventrikulärer Ausflusstrakt (right ventricular outflow tract)
s.c.	Subkutan
SD	Sprague-Dawley
SEM	Standardfehler
s	Sekunde
sEng	lösliches Endoglin ( <i>soluble endoglin</i> )
SEM	Standardfehler ( <i>standard error of the mean</i> )
sFlt-1	lösliche fms-ähnliche Tyrosinkinase-1 ( <i>soluble fms-like tyrosine kinase-1</i> )
T	Desoxythymidintriphosphat
Tab.	Tabelle
TGR	Transgene Ratte
ü.N.	über Nacht

V	Volumen
VEGF	vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor ( <i>vascular endothelial growth factor</i> )
VEGF-A/B/C	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor A/B/C
VEGFR	Rezeptor des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors
WGA	Weizenkeim Agglutinin ( <i>wheat germ agglutinin</i> )
WT	Wildtyp

## Zusammenfassung

Weltweit stellt die Präeklampsie (PE) eine der Hauptursachen für mütterliche Morbidität und Mortalität dar [1, 2]. Die PE kann dabei zu diversen akuten Organschäden führen, zu den bekanntesten zählen die Proteinurie und das HELLP-Syndrom (Hämolyse, erhöhte Leberenzyme, niedrige Thrombozytenzahl). Allerdings steht auch das Herz unter dem Einfluss der PE, denn sowohl kardiale Veränderungen während der Schwangerschaft als auch ein erhöhtes Langzeitrisiko für kardiovaskuläre Probleme nach der Schwangerschaft können Folge einer PE sein. [3, 4]. Die genauen pathophysiologischen Mechanismen sind dabei noch immer unbekannt. Es wurde aber gezeigt, dass eine Dysregulation des lokalen und zirkulierenden Renin-Angiotensin-Systems (RAS) Teil der Pathophysiologie ist [5-7] und eine mögliche Ursache für die mangelhafte uteroplazentare Durchblutung darstellt [8]. Die Blockade des RAS wäre daher ein vielversprechendes therapeutisches Ziel in der Schwangerschaft und ein wichtiges Medikament auch für die Therapie der Schwangerschaftshypertonie. RAS-Inhibitoren können allerdings die Plazentaschranke passieren [9] und sind wegen ihrer Fetotoxizität während der Schwangerschaft streng kontraindiziert [9, 10]. Zu diesem Zwecke wurde im Rahmen dieses Versuchs die Wirksamkeit eines Peptid-Antagonisten gegen den Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1 (AT1-R) im transgenen Rattenmodell getestet. In der Telemetrie konnte bei PE-Tieren, welche mit Peptid-Antagonisten behandelt wurden (PE + Peptid), im Vergleich zu PE-Tieren, die mit dem Vehikel behandelt wurden (PE), eine Verringerung des Blutdrucks an Tag 15 bis 20 festgestellt werden. Die kardiovaskulären Veränderungen wurden am Ende der Schwangerschaft (Tag 21) mittels Echokardiographie, Immunhistochemie und Genexpressionsanalyse am linken Ventrikel sowie mittels BNP-ELISA (brain natriuretic peptide Enzyme-linked Immunosorbent Assay) im Plasma untersucht. Echokardiographisch konnten wir zeigen, dass PE + Peptid Tiere höhere negative Werte für den globalen longitudinalen Strain (GLS) im Vergleich zu PE-Tieren aufwiesen. Weiterhin zeigten PE + Peptid Tiere immunhistochemisch eine deutlich reduzierte linksventrikuläre Hypertrophie, perivaskuläre Fibrose und mediale Wandverdickung sowie eine reduzierte Makrophagenanzahl im Myokard. Auf der Ebene der Genexpression führte die Behandlung mit dem Peptid-Antagonisten zu einer Herunterregulierung der Genexpression des Fibrosemarkers *Ctgf* (connective tissue growth factor) und zu einer Verbesserung der Herzfunktion, welche sich durch eine erhöhte Genexpression von *Myh6* (myosin heavy chain 6) und eine verringerte Genexpression von *Myh7* zeigte.

## Abstract

Pre-eclampsia (PE) presents one of the main causes of maternal morbidity and mortality worldwide [1, 2]. As such, PE can lead to various acute organ damage, with proteinuria and HELLP syndrome (hemolysis, elevated liver enzymes, low platelet count) being among the most well-known complications. The heart, however, is also affected during PE, as not only cardiac changes during pregnancy but also an increased long-term risk of cardiovascular problems after pregnancy can be a consequence of PE [3, 4]. While the exact pathophysiological mechanisms of PE are still unknown, a dysregulation of the local and circulating renin-angiotensin system is suspected as part of the pathophysiology [5-7] and possibly responsible for the inadequate uteroplacental blood flow [8]. Blockade of the RAS appears to be a promising therapeutic target and an important drug also for the therapy of gestational hypertension. Currently prescribed RAS inhibitors during PE, however, can cross the placenta [10], and are strictly contraindicated during pregnancy due to their fetotoxicity [9, 10]. For this purpose, the efficacy of a peptide antagonist against the angiotensin II receptor type 1 (AT1-R) was tested in the transgenic rat model. In this regard, telemetry showed a reduction in blood pressure at day 15 to 20 in PE animals treated with the peptide antagonists (PE + peptide animals) compared with PE animals treated with vehicle (PE animals). Cardiovascular alterations were assessed at the end of pregnancy (day 21) by echocardiography, immunohistochemistry and gene expression analysis in the left ventricle as well as by BNP-ELISA measurement in the plasma. Echocardiographically, we demonstrated that PE animals treated with the peptide antagonist (PE + peptide) had higher negative global longitudinal strain (GLS) values compared with PE animals treated with vehicle (PE). In addition, PE + peptide animals showed significantly less perivascular fibrosis, medial wall thickening and left ventricular hypertrophy as well as a lower number of macrophages in the myocardium by immunohistochemical staining. At the level of gene expression, peptide antagonist treatment resulted in downregulation of fibrosis marker *Ctgf* (connective tissue growth factor) as well as to an improvement in cardiac function, as evidenced by increased gene expression of *Myh6* (myosin heavy chain 6) and decreased gene expression of *Myh7*.

# 1. Einleitung

## 1.1. Allgemein

Präeklampsie (PE) betrifft etwa 3 % aller Schwangerschaften [11, 12] und ist definiert als neu auftretender Bluthochdruck ( $\geq 140/90$  mmHg) nach der 20. Schwangerschaftswoche in Verbindung mit mind. einer systemischen Komplikation, welche z.B. die renalen, hämatologischen, hepatischen, neurologischen und/oder pulmonalen Funktionen betreffen kann und keiner anderen Ursache zurückzuführen ist (Abb.1) [13]. Eine Proteinurie ( $\geq 300$  mg/d oder Protein-Kreatinin-Ratio  $\geq 30$  mg/mmol), als zweites Charakteristikum, gehört zwar zu den häufigsten Endorganschäden [14], ist nach aktuellen Empfehlungen jedoch nicht mehr obligatorisch für die Diagnosestellung und kann durch eine andere Organbeteiligung ersetzt werden. Die mütterlichen Organkomplifikationen sind divers und reichen von einer kardialen Dekompensation, disseminierten intravasalen Koagulopathie, dem intrauterinen Fruchttod bis hin zur Eklampsie [13].

### Abb. 1 – Definition der PE

Die Diagnose einer PE kann bei Vorliegen eines neu auftretenden Bluthochdrucks sowie mind. einer systemischen Komplikation gestellt werden. Die Komplikationen sind divers und können unterschiedliche Organsysteme (Gehirn, Leber, Niere etc.) der Mutter betreffen sowie das fetale Wachstum beeinträchtigen. DIC = disseminierte intravasale Koagulopathie, HELLP = Haemolysis, Elevated Liver Enzyme Levels, Low Platelet Count, IUGR = intrauterine Wachstumsrestriktion.



## 1.2. Epidemiologie und Ätiologie

Weltweit ist die PE für über 70 000 maternalen Todesfällen pro Jahr verantwortlich [15] und stellt somit als einer der Hauptursachen für mütterliche Morbidität und Mortalität ein wesentliches gesundheitliches Risiko dar [1, 2]. Die PE wird weiterhin mit 500 000 Todesfällen der Feten [15] auch mit einem erhöhten fetalen Gesundheitsrisiko assoziiert, wie z.B. ein erhöhtes Risiko für eine intrauterine Wachstumsrestriktion (25 %), eine Frühgeburt (27 %) bis hin zum intrauterinen Tod (4%) [16, 17]. Gleichzeitig weisen Schwangere mit PE neben den akuten Organkomplikationen u.a. auch ein erhöhtes kardiovaskuläres Langzeit-Risiko für z.B. Bluthochdruck, Schlaganfall, ischämische Herzerkrankungen und Herzinsuffizienz auf [3]. Dieses Risiko steigt zusätzlich durch bereits bestehende Risikofaktoren wie z.B. einem metabolischen Syndrom oder Nikotinkonsum an [18].

Bei der PE ist von einer multifaktoriellen Genese auszugehen, welche komplex verläuft und bis heute nicht vollständig geklärt ist. Dennoch kann auf einige gemeinsame pathophysiologischen Mechanismen geschlossen werden. Darunter zählt das abnorme Remodelling der Spiralarterien in der Frühschwangerschaft [19, 20], welche als Endarterien des uteroplazentaren Kreislaufs das Blut direkt in den intervillösen Raum (Kavitäten zwischen den Chorionzotten) der Plazenta leiten [2]. Des Weiteren spielt eine endotheliale Dysfunktion mit Ausfall der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase eine wichtige Rolle. Die Folge ist sowohl eine lokale als auch systemische Vasokonstriktion [17, 18, 20, 21]. Lokal führt es zu einer verminderten uteroplazentaren Perfusion bzw. systemisch zu einer arteriellen Hypertonie, gefolgt von verschiedensten Organkomplikationen.

## 1.3. Pathogenese

### 1.3.1. Plazentationsstörung

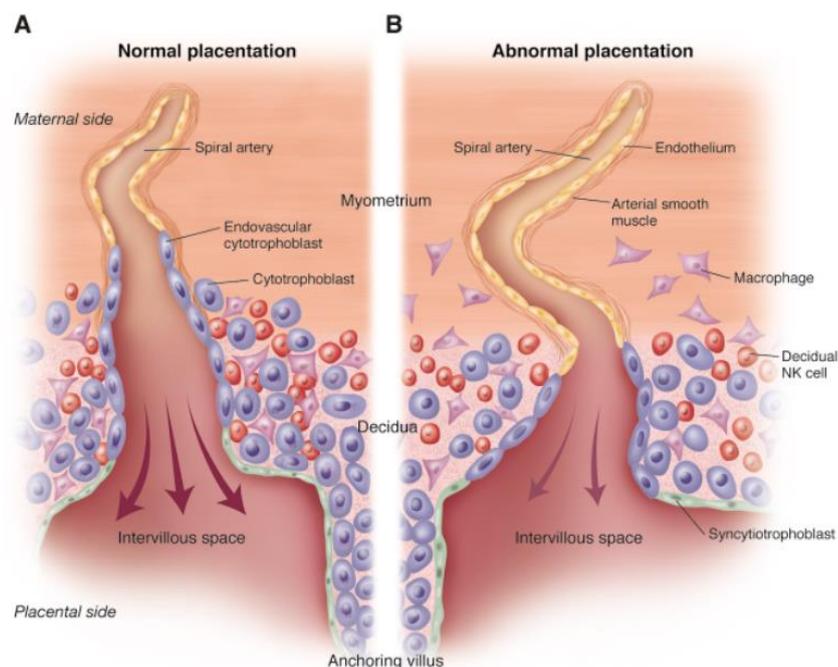
Das Krankheitsbild einer PE scheint wahrscheinlich ebenso heterogen in ihrer Entstehung, wie in ihrem klinischen Erscheinungsbild zu sein [11]. Zentral steht pathophysiologisch eine Plazentationsstörung bzw. Plazentainsuffizienz (Abb. 2) [22]. In der gesunden Schwangerschaft entwickelt sich die Plazenta aus fetalen Trophoblasten und der mütterlichen Decidua, welche als Teil des Endometriums durch Verankerungszotten mit der Plazenta verbunden ist [23]. Während der normalen

Plazentation durchqueren die Zytotrophoblasten diese plazentarisch-maternalen Verbindungsstellen und dringen in die mütterliche Dezidua sowie in die angrenzenden Spiralarterien ein (Abb. 2 A) [2]. Dort ersetzen sie einen Teil des mütterlichen Endothels und wandeln dabei kleine, hochohmige in großkalibrige kapazitive Gefäße um, damit eine angemessene Plazentadurchblutung gewährleistet wird [24].

Bei der PE erfolgt diese Trophoblasteninvasion nur unvollständig und beschränkt sich auf die oberflächlichen Schichten der Dezidua (Abb. 2 B) [24]. Die Folge ist eine plazentare Hypoperfusion und damit einhergehende hypoxische und oxidative Schäden [2], wobei bis heute nicht klar ist, ob die PE Ursache oder Folge der Plazentahypoxie/-ischämie ist [24].

### Abb. 2 – Normale und gestörte Plazentation bei der Präeklampsie

Normale (A) und gestörte Plazentation (B) in der 15. bis 16 Schwangerschaftswoche. Die Plazenta ist durch Verankerungszotten mit der mütterlichen Dezidua verbunden. Während der normalen Plazentation durchqueren Zytotrophoblasten (blau) diese plazentarisch-maternalen Brücken und dringen in die mütterliche Dezidua und die angrenzenden Spiralarterien ein. Sie durchdringen die Wände der Arterien und ersetzen einen Teil des mütterlichen Endothels (gelb), wodurch ein Umbau der Arterienwand angeregt wird, sodass die glatte Muskulatur verloren geht und sich die Arterie erweitert. In der Dezidua treffen sie auf zahlreiche NK-Zellen (rot) und einige Makrophagen (lila). Während einer normalen Schwangerschaft erleichtern diese Immunzellen das tiefe Eindringen von Zytotrophoblasten in die Myometriumsegmente (A) und fördern den umfassenden Umbau der Spiralarterie. Im prä-klinischen Stadium der PE ist die Invasion (B) und damit das Remodelling der Spiralarterien gestört. From Redman 2005 [2]. Reprinted with permission from AAAS.



### 1.3.2. Vasoaktive Mediatoren

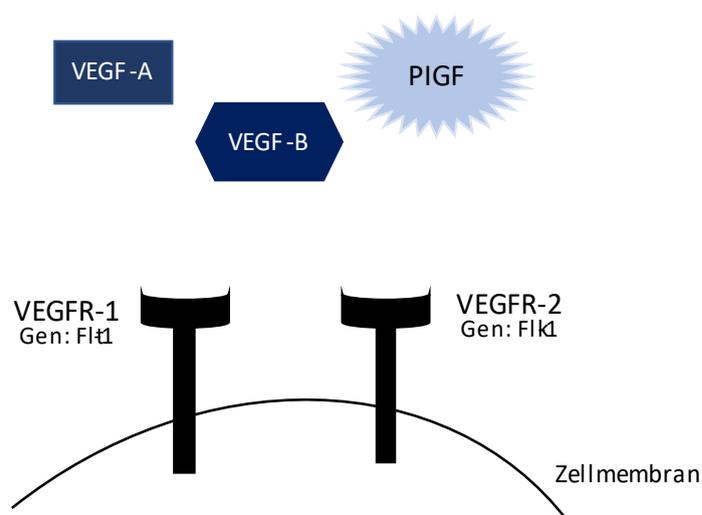
Die Hypoperfusion der Plazenta führt wiederum zur Ischämie und ist damit ein wichtiger Stimulus für Freisetzung unterschiedlicher vasoaktiver Faktoren in den mütterlichen Blutkreislauf [20, 25], welche ein Ungleichgewicht zwischen proangiogenen (z. B. vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF), plazentarer Wachstumsfaktor (PlGF)) und antiangiogenen Faktoren (z. B. lösliche fms-ähnliche-Tyrosinkinase-1 (sFlt-1) und sEndoglin (sEng) bewirken [26-28].

#### a) Proangiogene Faktoren

VEGF (auch als VEGF-A bezeichnet) gehört zu einer Genfamilie, zu der auch VEGF-B, VEGF-C und VEGF-D gehören [29], sowie das in der Schwangerschaft häufiger vorkommende PlGF [30]. VEGF-A/B und PlGF wirken dabei vor allem über die VEGF-Rezeptoren 1 (VEGFR-1/ Gen: Flt-1) und/oder VEGF-Rezeptor 2 (VEGFR-2/ Gen: Flk-1) (Abb. 3) [29].

#### Abb. 3 – VEGF-Rezeptoren

VEGF-A/B und PlGF entfalten ihre Wirkung über den VEGF-Rezeptor-1 (Gen: Flt-1) und VEGF-Rezeptor-2 (Gen: Flk1).



VEGF hat eine anti-apoptotische sowie eine wachstumsfördernde Wirkung und bestimmt in einer physiologischen Schwangerschaft die normale Endothelfunktion [29]. PlGF beeinflusst hingegen die Gefäßentwicklung und das Gefäßremodelling

insbesondere durch Bildung neuer Verzweigungen [31]. Darüber hinaus steigert PlGF die VEGF-Aktivität durch kompetitive Bindung an den VEGFR-1, so dass VEGF nun den VEGFR-2 aktiviert, welcher eine stärkere Tyrosinkinase-Aktivität besitzt [31].

## b) Antiangiogene Faktoren

Die lösliche fms-ähnliche Tyrosinkinase sFlt-1 stellt eine alternativ gespleißte Form des VEGFR-1 [32, 33] dar und wird in der präeklampsischen Plazenta vermehrt gebildet [26]. Neben einem signifikanten Anstieg der mRNA-Expression von sFlt-1 in der Plazenta, konnte das Protein auch in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) und in der Amnionflüssigkeit nachgewiesen werden, wodurch letztendlich auch der zirkulierende sFlt-1-Anteil ansteigt [21, 25]. Während der Schwangerschaft sezerniert die Plazenta jedoch neben sFlt-1 auch große Mengen von PlGF in den mütterlichen Kreislauf. sFlt-1 bindet wiederum freies VEGF und PlGF und reduziert so deren Bioverfügbarkeit für ihre Membranrezeptoren bzw. damit ihre Aktivität an vaskulären Endothelzellen [34, 35]. Tatsächlich konnte in Tiermodellen ein Anstieg von sFlt-1 bzw. ein Abfall des PlGF in Zusammenhang mit charakteristischen Zeichen der PE (Bluthochdruck, Proteinurie, glomeruläre Endotheliose etc.) gebracht werden [26]. Auch in humanen Fall-Kontroll-Studien zeigten präeklampsische Patientinnen erhöhte zirkulierende sFlt-1-Spiegel und erniedrigte Spiegel von PlGF und VEGF, welche sogar im Vergleich zu gesunden Schwangeren um mehrere Wochen vor den klinischen Symptomen auftraten [35]. sFlt-1 und PlGF können somit als prädiktive Werte für das Auftreten einer PE sowie ihrer Komplikationen verwendet werden [22, 36].

Zwei weitere Mediatoren, welche wie sFlt-1 in hohen Mengen von den Synzytiotrophoblasten der Plazenta freigesetzt werden, sind Endothelin-1 (ET-1), welches eine gefäßverengende Wirkung hat [37], und soluble Endoglin (sEng), welches schon mehrere Monate vor dem Auftreten der klinischen Symptome der PE erhöht ist [38] und synergistisch mit sFlt-1 zu einer endothelialen Dysfunktion beitragen kann [39]. Tatsächlich konnte in einer Studie von Levine et al. [38] sogar gezeigt werden, dass der Quotient aus der Summe von sFlt1 und sEng durch die Menge an PlGF stärker prädiktiv für eine PE ist als die einzelnen Biomarker.

## 1.4. Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) ist entscheidend für die renale Natrium- und Wasserrückresorption und die Aufrechterhaltung des arteriellen Blutdrucks [40]. Das Enzym Renin, eine Aspartylproteinase [40], wird von den juxtaglomerulären Zellen des distalen Tubulus (Macula densa) der Nieren produziert und als Vorstufe (Prorenin) gespeichert [41]. Stimulus zur Renin-Freisetzung sind niedrige Natriumspiegel (tubuloglomeruläre Rückkopplung), ein niedriger Blutdruck, sowie die Aktivierung des Sympathikus [41]. Substrat von Renin ist das von der Leber sezernierte Angiotensinogen, das durch das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) 2 zum Dekapeptid Angiotensin I (ANG I) und weiter zu Angiotensin II (ANG II) gespalten wird [40]. ANG II entfaltet wiederum seine Bioaktivität über verschiedene Typen seines Rezeptors, AT1 und AT2 [42, 43]. Der ubiquitär vorkommende AT1-Rezeptor ist der dominierende Angiotensin-Rezeptor. Er ist an ein G-Protein gekoppelt, dessen Stimulierung zu einer Erhöhung des intrazellulären Kalziums führt. Dadurch kommt es zu einer Vasokonstriktion (Gefäßverengung), einer erhöhten Sympathikusaktivität sowie einer Natrium- und Wasserretention, letztere durch die Stimulierung der Aldosteronsekretion [41, 43]. Der kleinere Angiotensin-Rezeptor, AT2, wird bei Erwachsenen weniger stark exprimiert, überwiegt jedoch während der fetalen Entwicklung und reguliert die fetale Gewebeentwicklung [43].

### 1.4.1. RAAS und normale Schwangerschaft

Während der Schwangerschaft kommt neben dem zirkulierenden RAAS ein lokales, gewebespezifisches Renin-Angiotensin-System (RAS) in der Plazenta [44, 45] hinzu. Ein lokales RAS konnte sowohl im fetalen Plazentazottengewebe als auch im mütterlichen Plazentagewebe, also der Dezidua [8], nachgewiesen werden, und dies insbesondere um die Spiralarterien des Dezidua [40]. Das lokale RAS scheint während der Schwangerschaft an der Regulierung des uteroplazentaren Blutflusses, sowie des dezidualen Gefäßumbaus beteiligt zu sein. Eine erhöhte Expression von maternalem ANG in menschlichen dezidualen Spiralarterien steht im Zusammenhang mit einem gestörten Gefäßremodelling und verringert die uteroplazentare Durchblutung [40].

Im Rahmen einer normalen Schwangerschaft steigt das zirkulierende Renin, Angiotensinogen, ANG I, ANG II, Angiotensin 1-7 und Aldosteron an. Das ACE ist die

einzigste Komponente des RAS, die während der Schwangerschaft reduziert gebildet wird [43]. Zusätzlich ist ihre Aktivitätsrate während der normalen Schwangerschaft geringer. Bei PE-Patientinnen steigt diese wieder auf Normwerte an [46]. Weiterhin ist während einer normalen Schwangerschaft die vaskuläre Reaktionsfähigkeit auf Ang II trotz erhöhter Plasmaspiegel vermindert [8]. Schwangere Frauen bleiben daher trotz eines zweifachen Anstiegs des zirkulierenden Ang II normotensiv [5].

#### 1.4.2. RAAS und Präeklampsie

Auch wenn die genauen pathophysiologischen Mechanismen der PE weiterhin unbekannt bleiben, gibt es experimentelle Hinweise, dass eine Dysregulation des lokalen und zirkulierenden Renin-Angiotensin-Systems Teil der Pathophysiologie ist [5-7] und möglicherweise für die mangelhafte uteroplazentare Durchblutung verantwortlich ist [8]. So ist eine Dysregulation des RAS, insbesondere in der Frühschwangerschaft, eng mit einer fehlerhaften Differenzierung der Trophoblastenzellen und einem Ungleichgewicht zwischen pro- und anti-angiogenen Faktoren in Richtung Anti-Angiogenese verbunden [47]. Es bleibt jedoch unklar, ob die Dysregulation des RAS ein primär aktiver Mechanismus in der Pathogenese der Erkrankung ist oder ob es sich um eine organische Reaktion auf eine bereits bestehende Erkrankung handelt [48]. So weisen präeklampsische Patientinnen zum einen reduzierte zirkulierende ANG 1-7-Werte auf, dem vasodilatatorischen Arm des RAS [8, 46], zum anderen aber auch erniedrigte Renin-, ANG II, Aldosteronspiegel. Relativ gesehen sind die Aldosteronwerte allerdings bei gegebenem Reninspiegel hoch, was auf eine erhöhte Empfindlichkeit der Nebenniere gegenüber ANG II schließen lässt. [1, 8, 28]. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte vaskuläre und adrenale ANG-II-Reaktivität zu den Hauptmerkmalen der PE (wie z.B. erhöhte Plasmaspiegel von sFLT1) gehört und zu einem erhöhten kardiovaskulären Langzeitrisiko von Frauen mit PE beiträgt [1].

Erste Erkenntnisse bezüglich einer erhöhten ANG-II-Reaktivität ergab sich historisch aus der Studie von Gant et al. [49], welcher bei jungen erstgebärenden Patientinnen während der Schwangerschaft sequentiell die Blutdruckreaktion auf eine ANG-II-Infusion untersuchte. Während eine Gruppe über den gesamten Schwangerschaftsverlauf trotz Infusion von ANG II normotensiv blieb, konnte eine weitere Gruppe identifiziert werden, welche sich in der frühen Phase der Studie klinisch unauffällig

präsentierte und damit wie die normotensive Gruppe resistent gegenüber der pressorischen Wirkung von infundiertem ANG II war. Im Verlauf zeigte diese Gruppe jedoch klinische Anzeichen einer schwangerschaftsbedingten Hypertonie und in einem Fall einer Eklampsie. Tatsächlich entwickelten viele bereits zwischen der 23. und 26. Schwangerschaftswoche eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber ANG II, jedoch ohne klinische Symptome zu präsentieren. Die abnehmende Resistenz trat somit also lange vor der Entwicklung einer Hypertonie auf, sodass im Umkehrschluss die schwangerschaftsbedingte Hypertonie wohlmöglich ein Versagen der physiologischen Anpassung an ANG II darstellt [49].

Neuere Studien konnten zeigen, dass die erhöhte Reaktivität u. a. aus der Dimerisierung zwischen dem vasopressorischen ANG II AT1-Rezeptor und dem vasodepressorischen Bradykinin B2-Rezeptor resultiert. Das AT1-B2-Proteinaggregat kann dabei eine vaskuläre Signalgebung auch in Abwesenheit von ANG II über eine Verstärkung der mechanischen Stimulation (z. B. durch eine erhöhte fetale Masse im späten Schwangerschaftsstadium) bewirken [1].

Eine zusätzliche Begründung für die gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber Angiotensin II bietet das Auftreten der agonistisch wirkenden Autoantikörpern gegen den AT1-R (AT1-AA) [50], welche bei Frauen mit PE signifikant häufiger vorhanden sind als bei Frauen mit einer normotensiven Schwangerschaft [50, 51]. Der Blutdruckanstieg als Reaktion auf erhöhte AT1-AA-Werte scheint hierbei unabhängig vom endogenen RAS und der Erhöhungen von ANG II zu sein [52]. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Wallukat haben wir erstmalig festgestellt, dass das Serum von Frauen mit PE einen IgG-Autoantikörper enthält, der den AT1-Rezeptor stimuliert [53]. Bei spontan schlagenden neonatalen Rattenkardiomyozyten konnte zudem gezeigt werden, dass AT1-AA die spontane Schlagfrequenz erhöhen [53]. Zudem konnte die Herzfrequenz im gleichen Versuch durch Zugabe eines AT1-R-Blockers wieder erfolgreich reduziert werden [53]. Die gleichzeitige Gabe von AT1 Antikörper und ANG II führte weiterhin im Rattenmodell neben dem Bluthochdruck zu weiteren klassischen Symptomen der PE wie z.B. Proteinurie, intrauteriner Wachstumsverzögerung und Arteriosklerose in der uteroplazentaren Einheit [54].

## 1.5. Kardiovaskuläres Langzeit-Risiko

Schon bei einer normalen Schwangerschaft wird eine Frau in einen zunehmend atherogenen Stoffwechszustand versetzt und sie entwickelt unter anderem ein höheres Herzzeitvolumen, eine Hyperkoagulabilität, Hyperlipidämie, Insulinresistenz und eine erhöhte Entzündungsaktivität [55, 56]. Jede dieser Schwangerschaftsveränderungen ist wiederum bei präeklampsischen Verläufen stärker ausgeprägt und stellt zum Teil einen wichtigen Risikofaktor für die Entwicklung einer PE dar [56]. Da also bereits eine normale Schwangerschaft eine erhebliche kardiovaskuläre Belastung für das mütterliche Herz darstellt und die kardiovaskuläre Dysfunktion bei einer PE dem klinischen Krankheitsbild vorausgeht, wird vermutet, dass eine mangelnde Adaptation des mütterlichen Herz-Kreislauf-Systems der primäre Mechanismus sein könnte, der zu einer sekundären Funktionsstörung der Plazenta führt [57].

Das erhöhte Blutvolumen wird dabei in einer normalen Schwangerschaft durch eine reversible, exzentrische Herzhypertrophie des linken Ventrikels kompensiert [58]. Diese tritt physiologisch auf und ist nicht von einer erhöhten Expression des atrialen natriuretischen Peptides (ANP) und oder des natriuretischen Peptid Typ B (BNP) gekennzeichnet [58]. Präeklampsische Frauen weisen dagegen einen erhöhten systemischen Gefäßwiderstand, sowie ein vermindertes zirkulierendes Blutvolumen auf [59]. Folge ist daher eine konzentrische Herzhypertrophie [60, 61], die in 40 % der betroffenen Frauen auch nach der Geburt persistiert [61]. Der engere Zusammenhang zwischen konzentrischer Geometrie und kardiovaskulären Ereignissen lässt sich durch eine verminderte myokardiale Kontraktilität, sowie ein größeres Risiko für Arrhythmien und plötzlichen Tod erklären [62]. Tatsächlich steigt bei präeklampsischen Patientinnen das Risiko für Herzversagen, Schlaganfall und Tod durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen, insbesondere in den ersten 10 Jahren nach der Schwangerschaft [63]. Jüngste Erkenntnisse zeigen zudem Anzeichen einer schweren diastolischen Dysfunktion bei Frauen mit PE, verbunden mit einem vierfach erhöhten Risiko für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz [63].

Sowohl das konzentrische Remodelling als auch die diastolische Dysfunktion und die Effektorhormone des RAAS (Renin, ANG-II, Aldosteron) stehen wiederum in einem engen Zusammenhang mit einer perivaskulären und interstitiellen Fibrose des

Herzens [64], welche sich durch eine Proliferation von Fibroblasten und einer erhöhten Ablagerung von Fibronectin (Fn) und Kollagen-Typ-I (Col1) zeigt [58]. Folgen der Fibrose sind eine erhöhte Steifigkeit der Matrix, eine gestörte Herzfunktion [65, 66] sowie eine Verlangsamung der Reizleitung und damit einhergehend ein erhöhtes arrhythmogenes Risiko [67].

## 1.6. Therapie der Präeklampsie

Die einzige wirksame Behandlung der PE ist nach wie vor die zeitgerechte Entbindung [68]. Die medikamentöse Therapie der PE konzentriert sich daher insbesondere auf die Kontrolle des Blutdrucks in der Schwangerschaft und ist derzeit auf drei Substanzklassen in der Erstlinientherapie (Metyldopa, Labetolol/Metropolol oder Calciumantagonisten) beschränkt. [69]. Es herrscht jedoch noch kein Konsens darüber, welche antihypertensive Substanz bei schwangeren Frauen am wirksamsten ist [70]. In Deutschland stellt Metyldopa das Mittel der 1. Wahl dar [13], wobei die Auswahl des richtigen Therapeutikums u.a. auch von den Nebenwirkungen, der Schwere des Bluthochdrucks, den Begleitsymptomen und der Zielwerterreichung abhängt [9, 71]. Unklar bleibt weiterhin, ob durch eine antihypertensive Behandlung eine präeklampsische Schwangerschaft verlängert werden kann [70]. Studien zu den gängigen Antihypertensiva weisen darauf hin, dass bei einer leichten bis mittelschweren Hypertonie während der Schwangerschaft zwar das Risiko eines schweren Bluthochdrucks verringert wird, es liegt aber kein sicherer Nachweis zur Verhinderung einer PE vor [70, 72, 73], und dies unabhängig davon, wie streng der Blutdruck kontrolliert wurde [74]. Weiterhin sind potenzielle Nebenwirkungen unter einer antihypertensiven Therapie zu berücksichtigen wie der fetalen intrauterinen Wachstumsretardierung [75]. Es ist daher festzuhalten, dass vor Behandlungsbeginn stets die Vorteile einer Blutdruckkontrolle gegen die potenziellen Risiken fetaler Komplikationen abgewogen werden müssen, insbesondere bei Patienten mit einer leichten Hypertonie, die möglicherweise durch eine antihypertensive Behandlung übertherapiert werden könnten.

Die neuere randomisiert kontrollierte CHAP-Studie konnte in diesem Zusammenhang wichtige Erkenntnisse zur Gabe von Antihypertensiva bei schwangeren Frauen mit einem leichten chronischen Bluthochdruck bringen [69]. So wurde gezeigt, dass diese

durch eine antihypertensive Behandlung mit einem Zielblutdruck von weniger als 140/90 mmHg im Vergleich zu denjenigen, die nur bei Auftreten eines schweren Bluthochdrucks ( $\geq 160$  mmHg systolisch oder  $\geq 105$  mmHg diastolisch) therapiert wurden, ein geringeres Risiko für die Entwicklung einer schweren PE bestand [69]. Dies jedoch ohne Erhöhung des Risikos für ein geringes Geburtsgewicht in Bezug auf das Reifealter (SGA, Small for Gestational Age) [69]. Da die CHAP-Studie einen eher geringen Effekt der antihypertensiven Therapie auf das Geburtsgewicht nahelegte, empfehlen die neuen NICE-Leitlinien (National Institute for Health and Care Excellence) aus dem Jahre 2019, bei schwangeren Frauen mit einem Bluthochdruck eine strengere Blutdruckkontrolle mit einem Zielblutdruck von 135/85 mmHg anzustreben [76].

Da die derzeit gängigen Therapeutika jedoch nicht direkt in das RAS-System eingreifen, bleibt unklar, ob diese die Pathophysiologie der PE beeinflussen und auf diese Weise potenziell kardiale Veränderungen bei einer PE (Hypertrophie, Inflammation etc.) umkehren können. Trotz einiger Fortschritte im Verständnis der Pathophysiologie hypertensiver Schwangerschaftsstörungen sind folglich keine parallelen Fortschritte in der Optimierung der antihypertensiven Therapien beobachtet worden [70]. Da das RAS allerdings nachweislich an der Pathophysiologie der PE beteiligt ist [5-7], stellt ihre Blockade eine vielversprechende Therapieoption dar. Tatsächlich konnte im Rattenmodell bereits gezeigt werden, dass durch die Entfernung des AT1A-R Genes eine Hypertonie, fetale Wachstumsrestriktion sowie diverse weitere Endorganschäden wie z.B. eine Herzhypertrophie verbessert bzw. verhindert werden können [77]. Eine Sorge von RAS-Blockern ist jedoch, dass sie bei der Verabreichung während der Schwangerschaft die Plazentaschranke passieren und mögliche negative Auswirkungen auf den Fetus ausüben [9]. Es besteht daher ein anhaltender Bedarf einen maternal spezifischen RAS-Inhibitor zu identifizieren, welcher das maternale Outcome verbessert, ohne dabei den fetalen Organismus zu gefährden.

### 1.7. Peptide – neues therapeutisches Target?

Peptide sind kleiner als Proteine und bestehen aus  $< 50$  Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von weniger als 5 - 10 kDa [78-80]. Viele Peptide wie z. B. Insulin werden bereits seit vielen Jahren eingesetzt und spielen eine wichtige Rolle bei der

Steuerung zahlreicher physiologischer Vorgänge [81], sowie beim Einsatz als Therapeutika in Bereichen wie Diabetes, Onkologie, Stoffwechsel-, Herz-Kreislauf- und Infektionskrankheiten [78]. Die orale Verabreichung nicht modifizierter Peptide stellt jedoch aufgrund der hohen proteolytischen Aktivität und den niedrigen pH-Wert des Magens nach wie vor eine große Herausforderung für die pharmazeutische Industrie dar. Diesem Problem möchte man durch den Einsatz von an Nano-Carriern gekoppelten Peptiden entgegenreten, welche den Peptiden durch den Schutz eines frühzeitigen Abbaus im Magen-Darm-Trakt eine höhere Stabilität verleihen sollen [82].

Anders als bei den konventionellen Pharmaka, ist ein wesentlicher Vorteil von Peptiden, dass sie aus proteinogenen Aminosäuren bestehen, also körpereigenen Bausteinen, und als solche in der Regel gering toxisch sind [78, 82]. Dies ist in der Schwangerschaft besonders für den Fetus relevant. Aufgrund ihrer geringeren Halbwertszeit akkumulieren Peptide zudem kaum in Geweben, was zwar die Wirkung des Peptids in vivo verringert, aber gleichzeitig auch die Risiken, die durch Komplikationen des Peptids, sowie ihrer Abbauprodukte hervorgerufen werden könnten [80]. Die hohe Selektivität [83] und geringe Toxizität beruhen u.a. auf der hohen Affinität und Spezifität [80, 81, 84] von Peptiden, sowie ihrer geringen Immunogenität [79]. Der Peptid-Antagonist von Ferring gegen den AT1-R wurde in diesem Zusammenhang so entwickelt, dass dieser nicht die Plazentaschranke überwinden kann und würde somit als erster maternal spezifischer RAS-Inhibitor eine selektive Behandlung der Mutter ermöglichen. Darüber hinaus ist der Peptid-Antagonist insbesondere für die Behandlung der PE von Bedeutung, da dieser so gestaltet sein soll, dass er auch die AT1-AA bindet und damit deren stimulierende Wirkung auf AT1-R blockieren kann.

### 1.8. Transgenes Tiermodell

Transgene Tiermodelle helfen im Rahmen der präklinischen Phase (Phase 0) die Wirksamkeit und Unbedenklichkeit eines Wirkstoffes zu testen bzw. in diesem Fall den Einfluss eines neuen therapeutischen Peptid-Pharmakons auf funktionelle und strukturelle Veränderungen des mütterlichen Herzens zu untersuchen ohne humanes Gewebe zu verwenden.

Die Versuche wurden an schwangeren Sprague-Dawley-Ratten (SD) der Tierart *rattus norvegicus* im Alter von 8 bis 25 Wochen durchgeführt. Zwar konnten sowohl in Ratten als auch in Mäusen 2 Subtypen des AT1-R (AT1A-R, AT1B-R) identifiziert werden [85, 86], aber nur Ratten weisen eine dem Menschen ähnliche hämochoriale Plazentation mit tiefer Trophoblasteninvasion und ausgeprägtem uteroplazentärem Remodeling auf [87] und sind somit am ehesten mit der humanen Situation vereinbar [88]. In der Maus ist das mesometriale Dreieck, welches hinsichtlich der Trophoblastenzellinvasion der menschlichen Dezidua entspricht, weniger stark ausgebildet als in der Ratte und es findet keine endovaskuläre Trophoblastenzellinvasion statt [87, 89].

Im Unterschied zur humanen Schwangerschaft bleiben allerdings die Konzentrationen von Ang I und II unverändert, ähnlich der humanen Situation zeigen jedoch auch schwangere Ratten physiologisch einen Anstieg der Angiotensinogen- und Reninspiegel, sowie verminderte ACE-Spiegel [58].

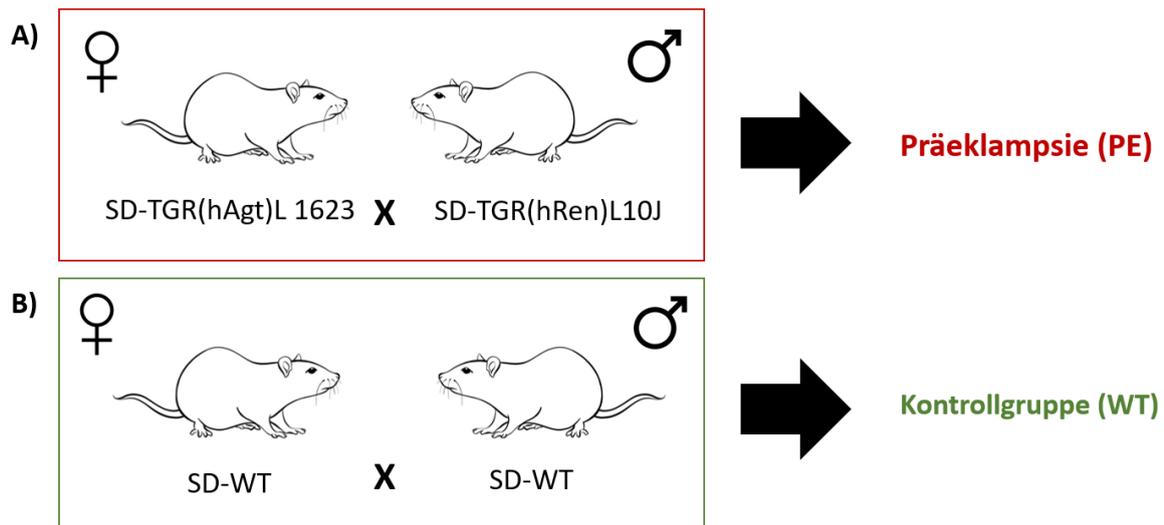
Weiblichen Ratten mit einem präeklampsischen Phänotyp entstehen nach Kreuzung einer weiblichen für das humane Angiotensinogen transgenen SD Ratte [SD-TGR(hAGT)L1623] mit einer männlichen Ratte, welche für das humane Renin transgen war [SD-TGR(hREN)L10J] (Abb. 4A).

Die nicht schwangere transgene Ratte präsentierte einen solchen Phänotyp nicht, da das menschliche RAS nicht mit dem RAS der Ratte interagiert [50]. Nur bei entsprechender Paarung führt die Wechselwirkung der beiden Transgenprodukte in der utero-plazentaren Einheit zu einer Sekretion von Renin aus der Plazenta und/oder dem Fetus [90]. Dieses interagiert wiederum mit zirkulierendem hAGT in den Müttern. Folge ist eine erhöhte Produktion von zirkulierendem ANG II [91] und damit die Entwicklung der typischen Komponenten der PE (Bluthochdruck, Proteinurie, wachstumsretardierte Nachkommen etc.) [92]. Weiterhin zeigten sich in diesem Tiermodell erhöhte ANG II Werte in der Plazenta und im mesometrialen Dreieck [50]. In der umgekehrten Verpaarung (weibliche hREN x männliche hAGT) sind in der Plazenta ANG II Werte ebenfalls nachweislich erhöht, im mesometrialen Dreieck sowie Blutkreislauf jedoch unverändert [50]. Dies ist ein Indiz, dass die Überproduktion und Sekretion des lokalen ANG II aus dem mütterlichen Teil der uteroplazentaren Einheit eine entscheidende Rolle bei der PE spielen könnte [91].

Gleichaltrige Wildtyp-Tiere (WT-Tiere) wurden für die Versuche ebenfalls gekreuzt und dienten als Kontrollen (Abb. 4B).

#### Abb. 4 – Versuchsaufbau

Weibliche Sprague-Dawley-Ratten [SD-TGR(hAGT)L1623] wurden mit männlichen Sprague-Dawley-Ratten gepaart, welche wiederum für das menschliche Renin-Gen [SD-Tg(hREN)L10J] transgen waren (Abb. 4A). Weibliche [SD-TGR(hAGT)L1623] Ratten entwickelten einen präeklampsischen Phänotyp (PE) mit typischen kardiovaskulären Veränderungen und gingen in den Versuch ein. Männliche [SD-TGR(hREN)L10J] wurden dagegen nur für die Verpaarung genutzt. Gleichaltrige Sprague-Dawley-Wildtyp-Ratten [SD-WT] wurden ebenfalls verpaart und dienten als Kontrolle (Abb. 4B).



Der Blutdruck bei diesen transgenen präeklampsischen Ratten steigt ab dem 12. Schwangerschaftstag an und kehrt innerhalb von 3 Tagen nachdem diese geworfen haben auf seinen Ausgangswert zurück. Der Bluthochdruck hält damit in der Schwangerschaft insgesamt 8 Tage an, was einem Drittel der gesamten Schwangerschaftsdauer entspricht. Es konnte weiterhin im gleichen Tiermodell gezeigt werden, dass ehemalige präeklampsische Ratten 28 Tage nach der Schwangerschaft eine signifikante Herzhypertrophie aufweisen, die sowohl in der Speckle-Tracking-Echokardiographie als auch in immunhistologischen Färbungen beobachtet wurde [58]. Im Herzgewebe konnte weiterhin postpartum eine erhöhte Fibrose und eine Reduktion kapillärer Gefäße beobachtet werden [58]. Auch in Humankohorten mit Patienten mit PE wurden echokardiographisch funktionelle Störungen des Herzens nachgewiesen [93]. Kräker et al. [90] stellte zudem echokardiographische Daten des transgenen Tiermodells mit einer humanen postpartum Kohorte gegenüber und konnte dabei nachweisen, dass das hier verwendete Tiermodell einen translationalen Charakter hat.

## 2. Zielsetzung

Im Rahmen dieses Versuches soll die Wirksamkeit eines Peptid Antagonisten des RAS (Anti-AT1-R) in einem transgenen Rattenmodell mit einem präeklampsischen Phänotyp getestet werden. Zur präklinischen Testung des Peptids wurden drei verschiedene Konzentrationen (1 nM, 3 nM, 10 nM) eingesetzt. Ziel der übergeordneten Studie ist es, den Einfluss der RAS-Blockade auf den Blutdruck und Komponenten des präeklampsischen Phänotyps (z.B. Proteinurie) zu untersuchen und die Auswirkungen auf das fetale Outcome zu evaluieren. Im Rahmen meiner Dissertation lag der Fokus auf das kardiovaskuläre System der Mutter mit dem Ziel, den Einfluss des Peptidantagonisten auf kardiale Veränderungen infolge der PE zu untersuchen. Dazu wurden funktionelle und strukturelle Veränderungen des Herzens sowie Veränderungen kardial relevanter Parameter im Herzen und im Plasma untersucht.

## 3. Material

### 3.1. Antikörper und Kits

Tab. 1 – Nummer und Herstellerangaben der Antikörper für die Immunhistochemie

Antikörper		Nummer	Hersteller
Anti-Col1	Anti-Type I Collagen	1310-01	Southern Biotech, Birmingham, USA
Anti-ED1	Anti-CD68	MCA341R	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Anti- FN	Anti-Fibronectin	Ab23751	Abcam, Cambridge, UK
Anti-IgG	Cy3-conjugated donkey anti-rabbit IgG	711-165-152	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Ely, UK
Anti-IgG	Cy3-conjugated donkey anti-mouse IgG	715-165-150	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Ely, UK
Anti-IgG	Cy3-conjugated donkey anti-goat IgG	705-165-003	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Ely, UK
WGA	Wheat Germ Agglutinin	FL-1021	Vector Laboratories, Burlingame, USA

**Tab. 2 – Herstellerangaben zu den Kits für die Genexpressionsanalyse und den ELISA**

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
cDNA Reverse Transcription Kit (4368813)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Rat BNP 45 (ab108816)	Abcam, Cambridge, UK
RNeasy Mini Kit (74106)	Qiagen GmbH, Hilden, DE

### 3.2. Reagenzien und Chemikalien

#### 3.2.1 RNA-Isolation und PCR

**Tab. 3 – Nummer und Hersteller der Reagenzien und Chemikalien für die Genexpressionsanalyse**

<b>Name</b>	<b>Nummer</b>	<b>Hersteller</b>
Chloroform	102445	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Destilliertes Wasser (dH <sub>2</sub> O)	SG Labostar	Evoqua Water Technologies GmbH, Günzburg, DE
DNA Digest Buffer	1011132	Qiagen GmbH, Hilden, DE
DNase I, RNase-free	1010395	Qiagen GmbH, Hilden, DE
Ethanol 99.8 % vergällt	K928.4	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Fast SYBR Green Master Mix	4385614	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
TaqMan Fast Universal PCR Master Mix [2x]	4367846	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

#### 3.2.2. Immunhistochemie

**Tab. 4 – Nummer und Hersteller der Reagenzien und Chemikalien für die Immunhistochemie**

<b>Name</b>	<b>Nummer</b>	<b>Hersteller</b>
Normal Donkey Serum	017-000-121	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Ely, UK
PBS [10x] pH 7.4	70011	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
QIAzol Lysis Reagent	79306	Qiagen GmbH, Hilden, DE

Citratpuffer [10x] pH 6.0	MKCD2290	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Vectashield Mounting Medium with DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindo)	H-1200	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Wasserstoffperoxid 30 wt. %	216763	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Xylol 100 %	4436	Carl Roth, Karlsruhe, DE

### 3.3. Geräte und Software

**Tab. 5 – Herstellerangaben der verwendeten Geräte**

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
DNA Thermal Cycler	Perkin-Elmer, Neuried, DE
Gewebeeinbettautomat Microm STP-120	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Microtome HM340E	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE
Paraffinausgießstation EG1160	Leica Biosystems, Nußloch, DE
QuantStudio 5 Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Vortex Mixer	Neolab, Heidelberg, DE
Scanner Panoramic MIDI BF/FL PMIDI-041409	3D Histech Ltd., Budapest, HU
Zentrifuge 5424, 5810 R	Eppendorf, Hamburg, DE
Zentrifuge GS 6KR	Beckman Coulter, München, DE

**Tab. 6 – Herstellerangaben der Softwares für die Datenanalyse**

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
Adobe Reader XI 11.0.23	Adobe Systems Inc., Dublin, IRL
Case Viewer	3D Histech Ltd., Budapest, HU
EndNote 20	Thomson Reuters, Carlsbad, USA

GraphPad Prism 9.5.0.	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
Image J 1.48v	National Institutes of Health, USA
Primer3 web 4.0.0	Whitehead Institute for Biomedical Research, USA
QuantStudio Design & Analysis V1.4	Thermo Fisher Scientific, USA
Vevo Strain 5.6.0	Visual Sonics, Toronto, CAN
Office 365 (Word, Excel)	Microsoft Office®, USA

### 3.4. Verbrauchsmaterialien

**Tab. 7 – Herstellerangaben der Verbrauchsmaterialien**

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>
Deckgläschen 24 x 50 mm	Menzel, Braunschweig, DE
Einbettkassetten für Paraffinschnitte	Roth, Karlsruhe, DE
Keramikkügelchen 2,8 mm	Peqlab, Erlangen, DE
<i>Micro Amp® Fast Optical 96-well Reaction Plate</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>Micro Amp™ Optical Adhesive Film</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Mikrotomklinge S35	Feather Safety Razor, Osaka, JPN
Objektträger Superfrost Plus 25x75x1 mm	Menzel, Braunschweig, DE
Pipettenspitzen	Starlab, Ahrensburg, DE
Reaktionsgefäße, (1,5; 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg, DE
Zentrifugenröhrchen (15; 50 ml)	BD Falcon, Franklin Lakes, USA

## 4. Methoden

### 4.1. Versuchstiere und Studiendesign

Die Planung und Durchführung der Tierstudie (G0018/19, Genehmigung am 07.03.2023) erfolgte durch entsprechend ausgebildeten technischen Assistenten und

Wissenschaftler. Die Haltung der Tiere wurde in der Tierhaltung am Max-Delbrück-Centrum (MDC) für Molekulare Medizin, Berlin-Buch, durchgeführt. Nach Abschluss der Tierstudie wurde das entnommene und bereits adäquat gelagerte Gewebe von mir für die Immunhistochemie und PCR (Polymerase-Kettenreaktion) verwendet. Die während der Studie durch technische Assistenten aufgenommenen echokardiografischen und telemetrischen Daten wurden ebenfalls von mir prozessiert. Mit der VevoStrain-Software führte ich die Speckle-Tracking-Echokardiographie durch, um den globalen longitudinalen Strain (GLS), die regionale Strain-Analyse und die Ejektionsfraktion (EF) zu bestimmen.

Die Ratten wurden gruppenweise in Tecniplast-Käfigen vom Typ SF1400, 1500 oder Typ IV (Grundfläche von 1800 cm<sup>2</sup>) gehalten. Alle Tierversuche wurden von der Tierschutzkommission des Landesamtes für Gesundheit und Soziales Berlin genehmigt. Nach erfolgter Implantation der Telemetriesender bzw. nach erfolgtem Nachweis der Schwangerschaft hielten sich die Versuchstiere über den gesamten Versuch einzeln auf, wodurch eine telemetrische Überwachung gewährleistet werden konnte. Die Einzeltierhaltung erfolgte in einer offenen Haltung in Rattenkäfigen des Typs III H (Grundfläche von 800 cm<sup>2</sup>) und ähnlich wie in einer Gruppenhaltung bei einer konstanten Temperatur von  $22 \pm 2$  °C, einer Luftfeuchtigkeit von  $55 \pm 15$  % und einem Lichtregime (12 h Wechsel Hell/Dunkel). Um eine kontinuierliche Aufzeichnung der Blutdruckparameter zu gewährleisten, verblieb der Käfig auf einer Telemetrieempfängerplatte. Das Hygienemonitoring erfolgte durch quartalsmäßige Untersuchungen gemäß den FELASA-Richtlinien. Die Tiere hatten zu Futter und Wasser Zugang ad libitum. Als Unterschlupf für die Tiere diente eine Plastikröhre, Beschäftigung war in Form von Nestbaumaterial und Papprolle gegeben (Enrichment).

Den Versuchstieren wurden im Alter von 8-12 Wochen (vor Beginn der Schwangerschaft) unter Inhalationsnarkose Telemetriesender implantiert (Abb. 5), durch den der systolische, mittlere und diastolische Blutdruck und die Herzfrequenz dauerhaft aufgezeichnet wurde. Das Telemetriesystem besteht aus einem 2,3 g schwerem Transmitter (HD-X11, DSI), einem Empfänger und dem Erfassungssystem. Der Transmitter wurde dabei infrarenal in der Aorta abdominalis platziert und mit einem Wundkleber im Gefäß befestigt bzw. anschließend mittels einer chirurgischen Naht am Peritoneum. Der Eingriff dauerte ca. 30 min und wurde auf einer Wärmeunterlage

durchgeführt. Mindestens 30 min vor dem Eingriff erfolgte die Zugabe von Carprofen (5 mg/kg s.c.), einem nichtsteroidalen Antirheumatikum. Nach der Einleitung der Narkose mit Isofluran (2-2,5 % Isofluran-Luft-Gemisch) wurde den Tieren eine schützende Salbe auf die Augen aufgetragen (Regepithel). Zur postoperativen Analgesie wurde eine 3-tägige postoperative Gabe von Metamizol mit Himbeer- geschmack über das Trinkwasser verabreicht (400 mg/kg/24h; Firma: Ratiopharm).

Nach Einhaltung der 10-Tage-dauernden Erholungszeit wurden die Tiere verpaart und der Tag, an dem ein Vaginalplug nachgewiesen werden konnte, wurde als Tag 1 der Schwangerschaft definiert (Abb. 5). Am 15. Tag der Schwangerschaft wurde die Intervention gestartet. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich die Versuchstiere bereits im letzten Drittel der Schwangerschaft und wiesen einen Bluthochdruck und Proteinurie auf [58], welche entscheidende Symptome für die Diagnose einer PE sind [50]. Diese Gruppe wurde daher als PE-Gruppe bezeichnet. WT-Tiere des gleichen Tierstammes wiesen keine Auffälligkeiten in Form eines Bluthochdrucks oder einer Proteinurie auf und galten als Kontrollgruppe. Das von Ferring hergestellte Peptid wurde dabei von den technischen Assistenten wie vorgeschrieben suspendiert und insgesamt 7 Tage lang (Schwangerschaftstag 15 - 21) über eine Mini-Osmosepumpen subkutan (Modell 2002, Alzet Scientific Corporation, PaltoAlto, Ca) verabreicht. Der Peptid-Antagonist wurde dabei in 3 Konzentrationen getestet. Daraus ergaben sich 5 Gruppen:

Gruppe 1 (n = 8), WT +Vehikel

Gruppe 2 (n = 9), PE + Vehikel

Gruppe 3 (n = 9), PE + Peptid (1 nM\*)

Gruppe 4 (n = 9), PE + Peptid (3 nM\*)

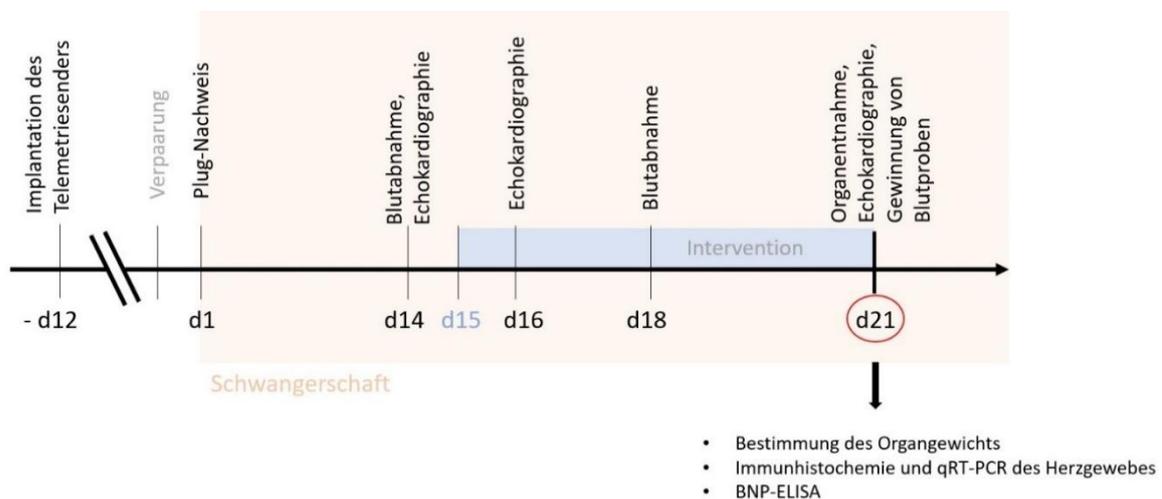
Gruppe 5 (n = 9), PE + Peptid (10 nM\*)

Um die durch PE verursachten maternalen Endorganschäden zu untersuchen, erfolgte die Organentnahme nach Euthanasie für die Muttertiere und Nachkommen am 21. Tag (d21) der Schwangerschaft (Abb. 5). Diese erfolgte durch eine kurze Inhalationsnarkose und anschließender Dekapitation entsprechend den europäischen Gesetzen des Tierschutzes, jeweils gefolgt von einer Blut- und Organentnahme. Nach

Probenentnahme des Herzens wurde dieses gewogen, in Stücke geteilt und anschließend in Formalin und Methylbutan für die Histologie aufbewahrt bzw. in flüssigem Stickstoff eingefroren und daraufhin bei - 80°C für die RT-qPCR gelagert.

#### Abb. 5 – Durchführung der Tierstudie

Mittels Telemetriesender kann der Blutdruck kontinuierlich aufgezeichnet werden. Dieser wird im Alter von 8-12 Wochen, noch vor der Schwangerschaft, implantiert. Eine Blutabnahme erfolgt an Tag 14 und 18 bzw. eine Echokardiographie an Tag 14, 16 und 21. Eine weitere Gewinnung von Blutproben für den BNP-ELISA sowie die Euthanasie der Muttertiere mit einer darauffolgenden Organentnahme findet am Ende der Schwangerschaft (Tag 21, d21) statt. Die Organe werden für weitere molekularbiologische und histologische Arbeiten aufbewahrt. Zusätzlich erfolgte am Tag 15 bis 21 die Intervention mit dem Peptid-Antagonisten bei PE-Tieren in drei unterschiedlichen Konzentrationen.



#### 4.2. Blutabnahme

Die Blutabnahme erfolgte durch technische Assistenten an Tag 14 und 18 aus der Schwanzvene (Abb. 5). Dabei wurden 500 µl Blut entnommen und in ein Röhrchen gegeben, das Kalium-Ethylendiamintetraessigsäure (K<sub>2</sub>EDTA) als Antikoagulans enthält. Die Blutröhrchen wurden mehrmals invertiert, um eine gute Mischung zu gewährleisten, bevor sie bis zur Verarbeitung auf Eis gelegt wurden. Anschließend wurden alle Blutproben zentrifugiert (1800 x g, 10 min, 4°C) und bei -80°C gelagert.

#### 4.3. Ultraschall

Die Tiere wurden durch technische Assistenten von der MDC Facility Animal Phenotyping während der transthorakalen Echokardiographie mit 1,5 % Isofluran über eine

Sauerstoffmaske betäubt. Währenddessen wurde die Herzfrequenz, die Rektaltemperatur des Muttertiers, sowie die Atmung überwacht. Die Körpertemperatur wurde durch eine Wärmeunterlage bei 36 °C bis 38 °C gehalten. Alle Haare wurden am Bauch entfernt und es wurden vorgewärmtes Gel als Ultraschall-Kopplungsmedium verwendet. Die schwangeren Ratten wurden am 14., 16. und 21. Schwangerschaftstag (Abb. 5) mit einem Ultraschall-Biomikroskop und einem 30-MHz- oder 40-MHz-Schallkopf mit 30 Bildern pro Sekunde abgebildet. Alle Bilder wurden von der MDC-Facility Animal Phenotyping erfasst und für die verblendete Offline-Analyse (Visual-Sonics VevoStrain-Software 5.6.0., Toronto, Kanada) bereitgestellt.

Um die Ejektionsfraktion (EF) und die globale longitudinale Dehnung (global longitudinal strain, GLS) zu erfassen, erfolgten die Messungen nicht-invasiv im sogenannten B-Mode in der parasternalen langen Achse. Die globale longitudinale Spitzendehnung stellt eine Myokarddeformationsanalyse dar und spiegelt in erster Linie die Funktion der subendokardialen, longitudinal ausgerichteten Fasern wieder, welche insbesondere durch ischämische Schäden und Wandstress beeinträchtigt werden [94]. Die GLS wurde dabei zur Messung der systolischen Funktion verwendet und ist im Vergleich zur EF reproduzierbarer und sensitiver und kann daher schon bei normalen Werten der EF pathologisch ausfallen [95]. Die sogenannte globale longitudinale „Strain-Rate“ (global longitudinal strain rate, GLSR) spiegelt hingegen die Geschwindigkeit dieser Deformation wider.

Die Erfassung der GLS erfolgte durch mich mittels Speckle-Tracking-Analyse, wobei drei aufeinanderfolgende Herzzyklen erfasst wurden und für jede Aufnahme wiederum der Mittelwert aus drei Messungen berechnet wurden. Bei der Analyse wurden zweidimensionale Graustufenbilder verwendet und sowohl die globale als auch die regionale linksventrikuläre (LV) Funktion beurteilt [95]. Positive Werte der GLS spiegeln eine Verlängerung der longitudinal ausgerichteten Myokardfasern wider, während negative Werte eine Faserverkürzung darstellen. Für die Berechnung der GLS wurde das Endokard des linken Ventrikels manuell in der in der enddiastolischen Phase markiert, wobei sich der Messwert der myokardialen Deformation aus dem Mittelwert der sechs einzelnen Segmente des linken Ventrikels bildete. Das Epikard wurde hingegen durch die Software automatisch erfasst und bei Bedarf manuell an die Wanddicke angepasst, um die Genauigkeit der Messung zu erhöhen. Die Bilder

wurden weiterhin auf ihre Qualität im Hinblick auf Differenzierbarkeit der Myokardränder und Abwesenheit von Artefakten überprüft, Bilder mit einer schlechten Qualität wurden dabei von der Analyse ausgeschlossen.

#### 4.4. Immunhistochemie

Zunächst wurde das Herz in Formalin fixiert. Nach einer Lagerung von mindestens 24 Stunden wurde das Gewebe in Paraffin eingebettet und über Nacht bei 4 °C gekühlt, um am nächsten Tag mit einem Mikrotom zu 2 µm großen Schnitten weiterverarbeitet, um auf Objektträgern fixiert zu werden. Vor jeder Färbung wurden die eingebetteten Schnitte rehydriert, indem sie zuerst zweimal in Xylol deparaffiniert wurden (2 x 5 min) und dann eine absteigende Ethanolreihe durchlaufen (100 %, 96 %, 80 %, 70 % für jeweils 5 min). Zur weiteren Bearbeitung wurden die Schnitte dreimal in 1x Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline, PBS) gewaschen.

#### Fluoreszenzfärbung:

Die Visualisierung der Kardiomyozyten wurde unmittelbar nach der Rehydrierung der Proben durchgeführt. Nach Blockierung der unspezifischen Bindung (60 min mit 10 % Normal Donkey Serum (NDS) in 1x PBS bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer) wurde das direkt gekoppelte Weizenkeimagglutinin (WGA) aufgetragen (1:100 in 10 % NDS, 4 °C über Nacht, feuchte Kammer). Ein sekundärer Antikörper war nicht erforderlich. Nach der Inkubation konnten die Proben mit Vectashield/DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindo) abgedeckt werden.

Alle weiteren Immunfluoreszenzfärbungen (Fibronektin, Fn; Kollagen Typ 1, Col1; ED1-positive Makrophagen, ED1) wurden der gleichen Vorbehandlung unterzogen. Nach der Rehydrierung erfolgte jedoch zuerst eine Demaskierung von Antigenen durch 20-minütiges Kochen in 1x Citratpuffer, gefolgt von der Blockierung endogener Peroxidasen durch Anwendung von 3 % Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) für 15 Minuten bei Raumtemperatur und abschließendem Waschen mit destilliertem Wasser für 3 x 5 Minuten. Im nächsten Schritt wurden unspezifische Bindungen mit 10 % NDS (in 1x PBS) für 60 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer blockiert. Die Proben wurden anschließend über Nacht bei 4 °C mit dem ersten Antikörper inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Objektträger 3 x 5 Minuten mit 1x PBS gewaschen und

120 Minuten bei Raumtemperatur mit dem zweiten Antikörper inkubiert. Im letzten Schritt wurden die Objektträger erneut 3 x 5 Minuten mit 1x PBS gewaschen und mit Vectashield/DAPI abgedeckt.

Die Konzentration und die Reaktionszeiten der primären und sekundären Antikörper sind je nach Färbung unterschiedlich:

**Tab. 8 – Verdünnungsprotokoll der primären und sekundären Antikörper für die Immunhistochemie**

<b>Färbung/ Primäre Antikörper (AB I°)</b>	<b>Verdünnung (AB I°)</b>	<b>Sekundäre Antikörper (AB II°)</b>	<b>Verdünnung (AB II°)</b>
Fibronectin/ Anti-Fibronectin	1:75 (in 10 % NDS)	Cy3-konjugiertes Esel-Anti- Kaninchen-IgG	1:300 (in 1x PBS)
Kollagen-Typ-I/ Anti-Typ-I-Kollagen	1:20 (in 10 % NDS)	Cy3-konjugiertes Esel-Anti-Ziegen- IgG	1:300 (in 1x PBS)
ED1/ Anti-ED1	1:100 (in 10 % NDS)	Cy3-konjugiertes Esel-Anti-Maus- IgG	1:300 (in 1x PBS)

Mit dem 3D Histec Slide Scanner kann das gesamte Gewebe sofort nach Abschluss der Färbung offline abgebildet und ausgewertet werden. Dies verhinderte einen Bleicheffekt oder ein Verblässen der Fluoreszenz, welche nach einer gewissen Zeit auftritt. Die Färbungen wurden wie folgt ausgewertet:

#### 1. WGA:

Mit Hilfe des Case Viewers wurden 50 runde Kardiomyozyten pro Schnitt ausgewählt, welche gleichmäßig im Herzquerschnitt verteilt waren. Die WGA-Färbung bewertete die potenzielle Hypertrophie der Kardiomyozyten durch Messung des mittleren Umfangs der ausgewählten Zellen.

#### 2. Fibronektin:

Es wurden repräsentative Bilder ohne vaskulären Inhalt mit der Software Case Viewer aufgenommen. Mittels ImageJ konnte der interstitielle fibrotische Anteil bestimmt werden. Pro Schnitt wurden insgesamt 10 Bilder aufgenommen und ihr Mittelwert bestimmt.

### 3. Kollagen I:

Die Kollagen-I-Färbung wurde zur Bestimmung der perivaskulären Fibrose verwendet. Sämtliche intakten Gefäße eines Herzens wurden miteinander verglichen. Die mediale und fibrotische Fläche der Gefäße wurden dafür nachgezeichnet und jeweils in Relation zum Gefäßlumen gesetzt.

### 4. ED1

Makrophagen wurden manuell im CaseViewer markiert. Dafür wurden 10 repräsentative Bereiche (Zoom: 40x) pro Schicht ausgewählt und ihr Mittelwert gebildet.

#### 4.5. Gewebeanalyse mittels qPCR

Zur Analyse von spezifischen Markergenen erfolgt eine Quantifizierung der Desoxyribonukleinsäure (DNA) mittels Real-Time-PCR/ quantitative PCR (qPCR). Dazu wurde die Ribonukleinsäure (RNA) isoliert und anschließend in die stabilere komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) umgeschrieben. Zum Nachweis der cDNA können bei der qPCR zwei Verfahren angewendet werden: SYBR Green oder Taqman. Beim SYBR wird zum Nachweis von PCR-Produkten ein Farbstoff verwendet, welches doppelsträngige DNA bindet, beim Taqman dagegen eine DNA-Sonde, welche sequenzspezifisch ist und nach Hybridisierung mit der komplementären DNA-Sequenz ein Fluoreszenzsignal abgibt. Somit ist beim Taqman nicht die Menge des akkumulierten Endproduktes relevant, sondern der Zeitpunkt, an dem die Amplifikation erstmals durch Freisetzung eines Fluoreszenzsignals nachgewiesen wird. Je mehr Startkopien vorhanden sind, desto früher wird ein Anstieg des Fluoreszenzsignals gemessen [96].

#### 4.5.1. RNA-Isolierung

RNA aus Rattenherzgewebe wurde mit dem RNeasy Mini Kit isoliert und nach den von den Herstellern angegebenen Protokollen extrahiert. Dazu wurde unter einem Abzug ein kleines Stück der Herzspitze in ein 2 ml Eppendorf-Röhrchen mit 700 µl Qiazol und sechs Precellys-Keramikkügelchen überführt. Anschließend erfolgt die Homogenisierung in zwei Zyklen für jeweils 15 s in einem Precellys Gewebehomogenisator bei 5500 Umdrehungen pro Minute (rounds per minute, rpm), sowie eine Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min. Zu dem Homogenisat wurde dann 140 µl Chloroform hinzugegeben, 30 s manuell gemischt und für 2-3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei 12000 xg und 4 °C wurden 350 µl der wässrigen oberen Phase mit einem gleichen Volumen 70 %-igen Ethanols versetzt, gemischt und auf die RNeasy Mini Column aufgetragen. Nach einminütiger Inkubation bei Raumtemperatur und 30 Sekunden Zentrifugation bei 8000 xg wurde der Durchfluss verworfen und die Säule mit RW1-Puffer gereinigt. Die auf der Säule verbliebene DNA wurde mit 10 µl DNase + 70 µl RDD-Puffer verdünnt, verdaut und mindestens 30 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Säulen nochmal mit dem RW1-Puffer und zweimal mit RPE-Puffer gewaschen, wobei dazwischen jeweils eine Zentrifugation für 30 Sekunden bei 8600 xg erfolgt. Die Säule wurde 2 Minuten lang mit 30 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O inkubiert, und die RNA wurde durch Zentrifugation für 1 Minute bei 12900 x g geliert. Die Proben konnten schließlich bei -80 °C gelagert werden oder aber zuerst auf Eis gestellt werden, um die RNA-Konzentration am Spektrophotometer NanoDrop bei einer Wellenlänge von 260 nm zu messen. Dazu wurde zuerst RNase-freies Wasser auf das Messgerät aufgetragen und ihr Leerwert bestimmt, anschließend konnte 1 Mikroliter der Proben aufgetragen werden, wobei bei einer zu hohen Ausbeute an RNA, die Probe 1:1 mit RNase freiem H<sub>2</sub>O verdünnt wurde. Ziel war eine RNA-Konzentration von weniger als 2 µg/µl. Die Qualität der isolierten RNA konnte anhand des Absorptionsverhältnisses 260/280 und 260/230 beurteilt werden. Der Wert sollte bei etwa 2,0 liegen; liegt er darunter, ist die Probe wahrscheinlich mit Proteinen (Verhältnis 260/280) oder Phenol (Verhältnis 260/230) verunreinigt.

#### 4.5.2. Umschreibung (RNA zu cDNA)

Für die Synthese einzelsträngiger cDNA aus der RNA wurde das cDNA-Kit für die reverse Transkription nach dem Protokoll des Herstellers verwendet (siehe Abschnitt 7.1.2.). Das Kit verwendet kurze Oligonukleotid-Primer, die aus sechs zufällig kombinierten Basenpaaren bestehen. Daher haben sie eine hohe Wahrscheinlichkeit, an die Ziel-RNA zu binden [97]. Um die eine Konzentration von 2 µg/µl in einem Gesamtvolumen von 10 µl zu erreichen, wurden die RNA-Proben vor der Transkription mit Wasser verdünnt. Im nächsten Schritt wurde der 2x Reverse Transkription Master Mix (Tabelle 1) hinzugegeben und die RNA-Proben wurden in den Thermozykler gestellt. Dort erfolgte die Erwärmung der Proben zunächst für 10 min auf 25 °C, im nächsten Schritt für 120 min auf 37 °C und schließlich für 5 min auf 85 °C. In einem letzten Schritt wurden die cDNA-Proben auf 4 °C heruntergekühlt.

**Tab. 9 – Zusammensetzung des Mastermix für die Reverse Transkription**

Darstellung der Zusammensetzung des Mastermixs. Dieser besteht aus der Reverse Transkriptase, einem Puffer, den Random Primer, Wasser und dem Nukleotiden-Gemisch. dNTP = Desoxynukleosidtriphosphat

Bestandteile	Volumen (µl)/ Reaktion
10X Reverse Transkriptase Buffer	2
25X dNTP Mix (100 mM)	0,8
10X Reverse Transkriptase Random Primer	2,0
Reverse Transkriptase	1,0
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	4,2
Total	10

#### 4.5.3. qPCR

Die Nachweisverfahren (SYBR Green, Taqman), die bei der qPCR zum Einsatz kommen, beruhen beide auf eine Amplifikation, sowie Quantifizierung des Zielgens in Echtzeit. Beide Methoden verwenden Carboxy-X-Rhodamin (ROX) in einer konstanten Konzentration als passiven Referenzfarbstoff, der während der Reaktion nicht verändert wird.

Beim Taqman wird die 5'-3'-Exonuklease Aktivität der Taq-Polymerase verwendet, um ein Fluoreszenzsignal zu erzeugen. Taqman Oligonukleotid-Sonden sind dabei am 5'-Ende mit einem Reporter Farbstoff (FAM = 6-Carboxyfluorescein) markiert und am 3'-Ende der Sonde mit einem nicht-fluoreszierenden Akzeptor Farbstoff, dem Quencher (TAMRA = Tetramethylrhodamin). Die Spektralkurve der TAMRA-Anregung überschneidet sich dabei zum Teil mit derjenigen der FAM-Emission. So hat TAMRA ein Maximum der Anregungswellenlänge bei 544 nm und ein Maximum der Emissionswellenlänge bei 570 nm, während FAM ein Maximum der Anregungswellenlänge bei 492 nm bzw. ein Maximum der Emissionswellenlänge bei 517 nm hat. In einer intakten Oligonukleotid-Sonde führt die räumliche Nähe des Reporter Farbstoffs und des Quenchers dazu, dass das emittierte Fluoreszenzsignal des Reporters reduziert wird, da seine Energie auf den Quencher übertragen wird. Der Quencher befindet sich zwar in einem elektronisch angeregten Zustand, emittiert jedoch kein Licht. Dieser Vorgang wird als Förster-Resonanzenergietransfers (FRET) bezeichnet.

Sobald die Zielsequenz vorhanden ist, bindet die Sonde an den komplementären Strang zwischen den Primerstellen. Die 5'-Exonuklease Aktivität der thermostabilen DNA-Polymerase bewirkt die Freisetzung des Reporters vom Quencher. Durch Unterbrechen der räumlichen Nähe zwischen Reporter und Quencher steigt das Fluoreszenzsignal schließlich im linearen Abschnitt der exponentiellen Phase proportional zur Menge des PCR-Produkts an.

Der grüne SYBR-Farbstoff erzeugt im Gegensatz dazu ein Fluoreszenzsignal durch Interkalieren in die doppelsträngige DNA. Der SYBR-Farbstoff unterscheidet daher nicht zwischen Ziel-Oligonukleotiden und unspezifischen PCR-Produkten.

Um eine Konzentration von 10 ng/µl zu erreichen wird die cDNA 1:5 verdünnt (20 µl cDNA + 80 µl H<sub>2</sub>O). Anschließend wird ein Mastermix mit Puffer, Vorwärts- und Rückwärtsprimer, Sonde (Taqman; beim SYBR mit Wasser ersetzt) und destilliertem Wasser hergestellt (Tab. 2). Zur Quantifizierung der Probenkonzentration wurde eine Standardreihe verwendet. Dazu wurden 4 µl jeder cDNA-Probe als Standardmix kombiniert und fünf Verdünnungen (20, 10, 5, 2,5, 1,25 ng/µl) hergestellt. Für die Probenanalyse wurde der Mastermix (18,4 µl) mit jeweils 1,6 µl cDNA [10 ng/µl] ergänzt. Weiterhin wurde eine Negativkontrolle verwendet, bei der die 1,6 µl cDNA durch Wasser ersetzt wurde (NTC = no template control). 5 µl jeder Probe und jedes Standards und des NTC wurden als Duplikate in eine 96-Well-Platte gegeben. Die

gesamte Platte wurde im nächsten Schritt mit einer optischen Klebefolie abgedeckt, um eine Kontamination zwischen den Wells zu vermeiden, und bei 2200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Die Amplifikation der Proben erfolgte schließlich durch Platzierung der Platte in das QuantStudio 5 Real-Time PCR System.

**Tab. 10 – Zusammensetzung des Mastermix für die RT-qPCR (TaqMan oder SYBR Green Methode)**

Darstellung der Komponenten des Mastermixs. Dieser besteht aus einem MM Buffer, den Primern, einer Sonde, Wasser und der RNA. Beim Taqman wird die Sonde durch Wasser ersetzt. 1 Rxn = 1 Reaktion. MM = Mastermix, RNA = Ribonukleinsäure, cDNA = komplementäre Desoxyribonukleinsäure

Reagenzien	µl pro 1 rxn
[2x] uni MM Buffer (TaqMan Fast Universal PCR Master Mix oder Fast SYBR Green Master Mix)	2,5
Vorwärtsprimer [10 mM]	0,15
Rückwärtsprimer [10 mM]	0,15
Sonde (optional)	0,15
cDNA [5 mM]	0,4
Nuklease-freies Wasser	1,65
Gesamtvolumen	5

Das Protokoll für die Amplifikation im QuantStudio 5 Real-Time PCR System ist in der folgenden Tabelle (Tab.3) aufgeführt:

**Tab. 11 – PCR-Protokoll**

Die Tabelle zeigt den Temperaturablauf der verschiedenen Reaktionsschritte der Genexpressionsanalyse. Schritt 2 und 3 werden sowohl beim Taqman als auch beim SYBR in 45 Zyklen wiederholt.

\* Reaktionsschritte 4-6 fallen beim SYBR weg.

	Temperatur	Zeit
<b>Schritt 1</b>	95 °C	20 Sekunden
<b>Schritt 2</b>	95 °C	1 Sekunde
<b>Schritt 3</b>	60 °C	20 Sekunden
<b>Schritt 4*</b>	95 °C	1 Sekunde
<b>Schritt 5*</b>	60 °C	20 Sekunden
<b>Schritt 6*</b>	95 °C	1 Sekunde

X 45 

#### 4.5.4. Primerdesign und Herstellung

Die Sequenzen der verwendeten Primer und Sonden wurden mit der Software Primer Express 3.0 entworfen. Anschließend erfolgte die Synthese durch BioTez, in Berlin Buch. Das Primerpaar/ Sonde wurde dabei Exon-übergreifend hergestellt, damit eine Amplifikation von genomischer DNA vermieden werden konnte. Die Primer waren bereits vorhanden und standen mir zur Verfügung. Die Primersequenzen wurden zuvor von unserer Forschungsgruppe veröffentlicht [58, 98].

**Tab. 12 – Primer- und Sondensequenzen**

Alle Primer/Sonden wurden bestellt bei BioTeZ Berlin Buch GmbH. Die Nukleotidsequenzen sind in 5'-bis 3'-Richtung angegeben. A = Desoxyadenosintriphosphat, C = Desoxycytosintriphosphat, G = Desoxyguanosintriphosphat, T = Desoxythymidintriphosphat

Abk.	Genname	Sequenz forward Primer Sequenz reverse Primer Sequenz Probe
<i>36B4</i>	Saures ribosomales Phosphoprotein P0	5' GCC CAG AGG TGC TGG ACA T 3' 5' ATT GCG GAC ACC CTC TAG GA 3' 5' ACA GAG CAG GCC CTG CAC ACT CG 3'
<i>Anp</i>	Atriales natriuretisches Peptid	5' TCT GCC CTC TTG AAA AGC AAA 3' 5' CCC GAA GCA GCT TGA CCT T 3' 5' CTC TGC TCG CTG GCC CTC GGA 3'
<i>Bnp</i>	Natriuretisches Peptid Typ B	5' CAA GCT GCT TTG GGC AGA AG 3' 5' AAA CAA CCT CAG CCC GTC AC 3' 5' AGA CCG GAT CGG CGC AGT CAG TCG CTT 3'
<i>Col1</i>	Kollagen Typ 1	5' AGA GCG GAG AGT ACT GGA 3' 5' CTG ACC TGT CTC CAT GTT GCA 3' 5' CAA GGC TGC AAC CTG GAT GCC ATC 3'

<i>Ctgf</i>	Bindegewebs- Wachstumsfaktor	5' CGC CAA CCG CAA GAT TG 3' 5' CAC GGA CCC ACC GAA GAC 3' 5' CAC TGC CAA AGA TGG TGC ACC CTG 3'
<i>CD68</i>	Differenzierungscluster 68	5' CAC TTC GGG CCA TGC TTC T 3' 5' GGA GGA CCA GGC CAA TGA T 3'
<i>Fn</i>	Fibronektin	5' GGA CCT GCA CGC CAA TAG CT 3' 5' TCC CCC ACG ACG TAG GAA 3' 5' AGA AAT GTT TTG ATC ACG CTG CTG GGA 3'
<i>Mcp-1</i>	Monozyten- Chemotaktisches Protein-1	5' TGC AGT TAA TGC CCC ACT CA 3' 5' TCT CCA GCC GAC TCA TTG G 3' SYBR
<i>Myh 6</i>	Myosin 'schwere Kette' α	5' CGG GAG AAC CAG TCC ATC CT 3' 5' ACA CGC TTC GTG TTG ACA GTC T 3' 5' ATC ACT GAG AAT CCG GAG CGG G 3'
<i>Myh 7</i>	Myosin 'schwere Kette' β	5' GCC AAG ACA GTT CGG AAT GAT AA 3' 5' CCT GTT GCC CCA AAA TGG 3' 5' TCC TCC CGA TTT GGG AAA TTC ATT CG 3'
<i>Et-1</i>	Endothelin 1	5' AGG GAA AAC CCT GTC CCA AG 3' 5' CAC GGG GCT CTG TAG TCA AT 3' SYBR

#### 4.5.5. Analyse der Genexpressionsmessung

Die Analyse der Genexpressionsmessung erfolgte mittels Zyklusschwellenmethode, wobei der sogenannte Ct-Wert (Cycle Threshold, Schwellenwertzyklus) als Parameter zur Quantifizierung der anfänglichen DNA-Kopien verwendet wurde und der Zyklusanzahl entspricht, bei der das Fluoreszenzsignal einen festgelegten Schwellenwert überschreitet [99]. Der Ct-Wert steht dabei im umgekehrten Verhältnis zur

Ausgangsmenge des Targets. Beim Vergleich von Echtzeit-PCR-Ergebnissen von Proben, die unterschiedliche Mengen des Zielmoleküls enthalten, ergab eine Probe mit der doppelten Ausgangsmenge damit einen Ct-Wert, der einen Zyklus früher liegt als bei einer Probe, die vor der Amplifikation nur halb so viele Kopien des Zielmoleküls enthält [100].

Der Schwellenwert markiert den Nachweis von Fluoreszenz über dem Hintergrundsignal und wird für alle gemessenen Gene einheitlich auf 0,1 gesetzt, um die Vergleichbarkeit der Messungen zu gewährleisten. Das Reporter-Fluoreszenzsignal wurde bei der Analyse auf ROX normiert und das Hintergrundsignal wird im nächsten Schritt von diesen normalisierten Reporterwerten ( $R_n$ ) subtrahiert, um  $\Delta R_n$  zu erhalten. Während der Amplifikation unterscheidet man drei Phasen. In der exponentiellen Phase kommt es aufgrund der hohen Verfügbarkeit von Reagenzien zu einer konstanten Amplifikation und Verdopplung des Produkts, da die DNA-Polymerase noch hocheffizient arbeitet und die geringe Menge des Amplifikationsprodukt nicht mit den Primern konkurriert [100]. All diese Faktoren tragen zu einer genaueren Quantifizierung in der exponentiellen Phase bei [100]. In der linearen Phase nimmt die Steigung dagegen ab. Die Plateauphase zeigt schließlich das Ende der Reaktion an, da die Verfügbarkeit der Reagenzien abnimmt.

Die sogenannten Baseline-Werte können mit dem Hintergrund oder "Rauschen" der Reaktion gleichgesetzt werden und werden von der Analyse der Genexpression ausgeschlossen. Sie wurden empirisch auf drei Zyklen festgelegt, noch bevor die erste Probe den Schwellenwert überschritt, wodurch genügend Zyklen berücksichtigt wurden, um den Hintergrund in den ersten Zyklen der Amplifikation zu eliminieren, jedoch ohne die Zyklen zu berücksichtigen, in denen das Amplifikationssignal schon über den Hintergrund anstieg [100]. Beim Vergleich verschiedener Echtzeit-PCR-Reaktionen oder Experimenten sollte die Basislinie für alle auf dieselbe Weise definiert werden.

#### 4.6. Proteinnachweis mittels ELISA

Ein Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) wurde zur quantitativen Messung von BNP im Blutplasma bestimmt und nach den Herstellerangaben durch eine

technische Assistentin durchgeführt. Ein spezifischer BNP-45-Antikörper ist hierbei auf 96-Well-Platten vorbeschichtet und blockiert. Im ersten Schritt werden die Standard- oder Kontrollproben sowie der BNP-45-spezifische biotinylierte Nachweisantikörper in die jeweiligen Vertiefungen pipettiert. Anschließend erfolgt die Auswaschung mit einem Waschpuffer und die Zugabe einer Substratlösung, dem Streptavidin-Peroxidase-Konjugat. Ungebundene Konjugate werden in einem weiteren Waschschrift weggespült. TMB (3, 3', 5, 5' - Tetramethyl-benzidin) wird zur Visualisierung der enzymatischen Reaktion herangezogen. Nach Zugabe von TMB wird es durch die Streptavidin-Peroxidase katalysiert. Dabei entsteht ein blau gefärbtes Produkt, das nach Zugabe einer sauren Stopplösung in eine gelbe Farbe umschlägt. Die Dichte der Gelbfärbung bzw. die im Photometer gemessene Absorption (bei 450 nm) ist direkt proportional zu der in der Platte nachgewiesenen Menge an BNP 45. Die Konzentrationen des Nachweisproteins erhält man schließlich über eine Standardkurve.

#### 4.7. Statistik

Statistische Analysen wurden mit der Software Prism 9.5.0. (GraphPad Software Inc.) durchgeführt. Die graphische Darstellung erfolgte als Mittelwert  $\pm$  SEM (standard error of mean, Standardfehler). Bilddateien (Echokardiographie und histologische Färbungen) von schlechter Qualität, die eine Analyse nicht ermöglichten, wurden von der Analyse ausgeschlossen. Ein p-Wert von  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen. Für die statistische Analyse erfolgte zuerst ein Normalverteilungstest mit dem D'Agostino-Pearson und Shapiro-Wilk Test, bei einer parametrischen Verteilung wurde anschließend ein einfacher ANOVA mit Dunnett-Test durchgeführt, bei nicht-parametrischer Verteilung dagegen ein Kruskal-Wallis Test. Um den Blutdruckverlauf, den regionalen Strain sowie die regionale Strain-Rate zu analysieren wurde ein repeated measurement two-way ANOVA mit Bonferroni Post-Hoc-Test verwendet.

## 5. Ergebnisse

Das Ziel der vorliegenden Dissertation ist es, die Wirkung des Peptid-Antagonisten auf den kardiovaskulären Phänotyp bei schwangeren Ratten mit PE zu untersuchen. Im Ergebnisteil wurden die Daten der Gruppe mit der höchsten Peptid-Konzentration

(10 nM) aufgeführt, da diese Gruppe zusammenfassend die meisten positiven Veränderungen in der Telemetrie, Echokardiographie, Immunhistologie, PCR und im BNP-ELISA aufwies.

### 5.1. Telemetrie

Über einen Telemetriesender konnte der mittlere arterielle Blutdruck (MAP, Tab. 5), der systolische (SBP, Tab. 6) und der diastolische Blutdruck (DBP, Tab. 7) kontinuierlich aufgezeichnet werden. Die Graphen in der Abbildung 6 (1 – 3) zeigen den Mittelwert des jeweiligen Blutdruckwerts (MAP, SBP, DBP) von WT (grün), PE (rot) und PE + Peptid (blau) über die Zeit auf.

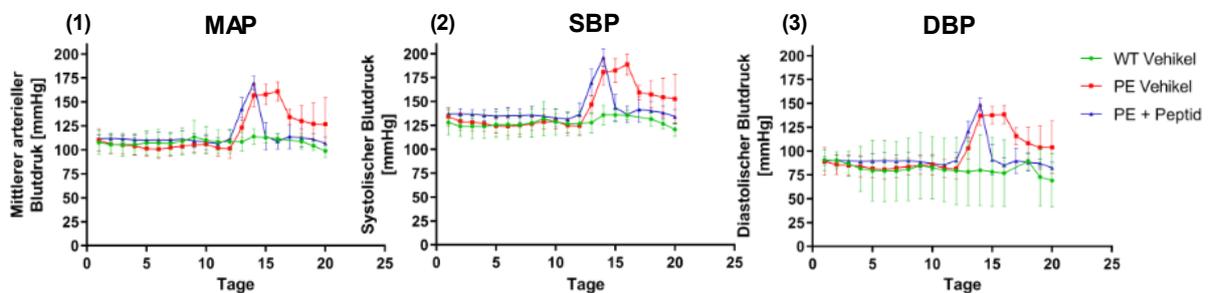
Der MAP wies an Tag 13 in PE + Peptid im Vergleich zu PE signifikant erhöhte Werte auf (PE  $101,21 \pm 4,22$  vs. PE + Peptid  $111,17 \pm 3,76$ ,  $p = 0,004$ ). WT und PE zeigten am selben Tag keine signifikanten Unterschiede auf, jedoch eine Tendenz zu erniedrigten Werten (WT  $108,4 \pm 4,36$  vs. PE  $123,15 \pm 4,19$ ,  $p = 0,09$ ). Ein Tag darauf stieg der MAP in der PE-Gruppe im Unterschied zu WT-Tieren signifikant an (WT  $113,84 \pm 3,5$  vs. PE  $156,77 \pm 4,76$ ,  $p < 0,0001$ ) und erreichte schließlich von Tag 14 bis 16 ein Plateau mit einem maximalen MAP von  $160,93 \pm 4,1$  an Tag 16.

Der maximale MAP der PE + Peptid Gruppe wurde bereits 2 Tage früher erreicht und zwar an Tag 14 mit einem Wert von  $169,58 \pm 2,69$ . Dieser Wert unterschied sich am gleichen Tag nicht signifikant zu PE-Tieren (PE  $156,77 \pm 4,76$  vs. PE + Peptid  $169,58 \pm 2,69$ ,  $p = 0,12$ ). Anschließend waren bei PE + Peptid fallende Blutdruckwerte nachweisbar. Von Tag 15 bis zum Ende der Blutdruckaufzeichnung (Tag 21) zeigten sowohl WT als auch PE + Peptid stets einen signifikant verringerten MAP. WT-Tiere wiesen über die gesamte Zeit nur geringe Blutdruckschwankungen auf und zeigten allenfalls geringe Erhöhungen des MAP an Tag 14-16 mit einem maximalen Wert von  $113,84 \pm 3,5$  an Tag 14.

Für den SBP und DBP konnte ein ähnlicher Verlauf beobachtet werden. Der SBP war jedoch bei WT-Tieren im Vergleich zu PE-Tieren auch am Tag 13 signifikant erniedrigt (WT  $127,77 \pm 4,82$  vs. PE  $146,74 \pm 3,91$ ,  $p = 0,02$ ).

**Abb. 6 – Mittlere arterielle Blutdruck (MAP), systolische Blutdruck (SBP) und diastolische Blutdruck (DBP)**

Die Graphen zeigen die Mittelwerte  $\pm$  SEM des MAP (1), SBP (1) und DBP (3). Grün: WT, rot: PE, blau: PE + Peptid. Es wurde auf eine Darstellung der statistischen Auswertung zu Zwecken der Übersichtlichkeit verzichtet. Repeated measurement two-way ANOVA: Ab Tag 13 der Schwangerschaft konnte bei PE-Tieren und PE + Peptid Tieren ein erhöhter MAP beobachtet werden, wobei PE + Peptid Tiere zu Beginn noch einen signifikant erhöhten Wert im Vergleich zu PE-Tieren aufwiesen. WT-Tiere zeigten hingegen über den gesamten Schwangerschaftsverlauf minimale Blutdruckschwankungen mit einer nur geringen Erhöhung des Blutdrucks ab Tag 14. PE-Tiere wiesen im Gegensatz dazu über den weiteren Verlauf stetig erhöhte Blutdruckwerte auf und erreichten ein Plateau an Tag 14-16. In der PE + Peptid Gruppe stieg der Blutdruck ab Tag 14 zuerst an, im weiteren Verlauf waren erniedrigte Werte nachweisbar. Ab Tag 15-20 zeigten sowohl WT-Tiere als auch PE + Peptid Tiere stets einen signifikant erniedrigten MAP. Der SBP und DBP zeigten einen ähnlichen Blutdruckverlauf wie der MAP, wobei der SBP bei WT-Tieren im Vergleich zu PE-Tieren schon ab Tag 13 erniedrigt war. An Tag 17 und/oder 18 war zum Teil eine telemetrische Aufzeichnung nicht möglich, da die Tiere 24 Stunden lang in metabolischen Käfigen gehalten wurden, um Urin zu sammeln. Daher waren insbesondere für WT-Tiere am Tag 17 keine Blutdruckdaten verfügbar. SEM = Standardfehler, WT Vehikel = Wildtyp-Kontrollgruppe (n = 5), PE Vehikel = Präeklampsiegruppe (n = 6), PE + Peptid = mit dem Peptid-Antagonisten behandelte Präeklampsiegruppe (n = 7), MAP = mittlere arterielle Blutdruck, SBP = systolische Blutdruck, DBP = diastolische Blutdruck.



**Tab. 13 – Telemetrie: mittlere arterielle Blutdruck (Tag 1 – 20)**

Der MAP wurde von Tag 1 bis 20 mit Hilfe eines Telemetriesenders aufgezeichnet. Dieser war am Tag 13 bei PE + Peptid Tieren im Vergleich zu PE-Tieren signifikant erhöht. WT-Tiere und PE + Peptid zeigten im Gegensatz zu den PE-Tieren von Tag 15 – 20 signifikant erniedrigte Werte. Alle Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. SEM = Standardfehler, WT Vehikel = Wildtyp-Kontrollgruppe (n = 5), PE Vehikel = Präeklampsiegruppe (n = 6), PE + Peptid = mit dem Peptid-Antagonisten behandelte Präeklampsie-gruppe (n = 7). ° Fehlende Daten: An Tag 17 und/oder 18 war eine telemetrische Aufzeichnung nicht möglich, da die Tiere 24 Stunden lang in metabolischen Käfigen gehalten wurden, um Urin zu sammeln. Repeated measurement two-way ANOVA, \*WT vs. PE: signifikant ( $p < 0,05$ ), † PE vs. PE + Peptid: signifikant ( $p < 0,05$ ).

Tag	WT	PE	PE + Peptid
1	107,71 ± 5,65	110,28 ± 4,62	111,49 ± 1,54
2	105,70 ± 4,39	105,82 ± 3,77	111,89 ± 1,97
3	105,52 ± 5,35	105,08 ± 3,77	111,36 ± 1,72
4	105,61 ± 5,08	103,89 ± 3,75	110,54 ± 1,88
5	107,20 ± 5,57	101,30 ± 3,16	110,27 ± 2,81
6	107,07 ± 6,48	100,76 ± 4,04	110,55 ± 3,16
7	106,73 ± 5,4	102,21 ± 3,73	110,36 ± 2,48
8	108,92 ± 6,41	103,65 ± 2,96	110,98 ± 3,18
9	113,29 ± 7,8	105,30 ± 3,26	109,68 ± 2,71
10	110,19 ± 6,36	105,85 ± 3,64	107,92 ± 3,03
11	108,24 ± 5,51	101,74 ± 3,3	106,44 ± 2,3
12	108,47 ± 5,36	101,21 ± 4,22	111,17 ± 3,76
13	108,40 ± 4,36	123,15 ± 4,19	142,86 ± 4,44†
14	113,84 ± 3,51*	156,77 ± 4,76	169,58 ± 2,69
15	112,68 ± 2,34*	157,70 ± 4,36	114,19 ± 5,45†
16	111,55 ± 2,13*	160,93 ± 4,1	108,72 ± 3,01†
17	Fehlend°	134,27 ± 4,63°	113,91 ± 5,7†°
18	108,78 ± 3,47*°	130,18 ± 6,42	112,52 ± 3,57†
19	104,27 ± 2,18*	126,95 ± 8,98	111,11 ± 2,05†
20	98,81 ± 2,84*	126,65 ± 11,32	106,65 ± 2,44†

**Tab. 14 – Telemetrie: systolische arterielle Blutdruck (Tag 1 – 20)**

Der SBP wurde von Tag 1 bis 20 mit Hilfe eines Telemetriesenders aufgezeichnet. Dieser war am Tag 13 bei PE + Peptid Tieren im Vergleich zu PE-Tieren signifikant erhöht. WT-Tiere zeigten im Vergleich zu PE-Tiere ab Tag 14 signifikant erniedrigte Werte. PE + Peptid Tiere dagegen ab Tag 15. Alle Werte sind als Mittelwert ± SEM angegeben. SEM = Standardabweichung, WT Vehikel = Wildtyp-Kontrollgruppe (n = 5), PE Vehikel = Präeklampsiegruppe (n = 6), PE + Peptid = mit dem Peptid-Antagonisten behandelte Präeklampsiegruppe (n = 7). ° Fehlende Daten: An Tag 17 und/oder 18 war eine telemetrische Aufzeichnung nicht möglich, da die Tiere 24 Stunden lang in metabolischen Käfigen gehalten wurden, um Urin zu sammeln. Repeated measurement two-way ANOVA, \*WT vs. PE: signifikant (p < 0,05), † PE vs. PE + Peptid: signifikant (p < 0,05).

Tag	WT	PE	PE + Peptid
1	127.93 ± 6.02	134.09 ± 3.82	137.19 ± 1.71

2	124.06 ± 4.71	129.01 ± 3.71	137.00 ± 2.12
3	123.92 ± 5.72	128.12 ± 3.59	136.60 ± 1.70
4	123.82 ± 5.48	126.81 ± 3.32	135.47 ± 2.23
5	125.77 ± 5.99	124.36 ± 2.97	134.73 ± 3.09
6	125.90 ± 6.91	124.06 ± 3.96	135.09 ± 3.30
7	125.38 ± 5.72	125.12 ± 3.67	135.10 ± 2.69
8	127.62 ± 6.73	126.62 ± 2.76	135.74 ± 3.35
9	131.87 ± 8.10	128.63 ± 3.20	134.47 ± 2.82
10	128.68 ± 6.30	128.98 ± 3.23	132.83 ± 3.45
11	126.66 ± 5.63	124.81 ± 3.09	131.37 ± 2.73
12	126.80 ± 5.59	124.46 ± 3.93	136.38 ± 4.52
13	127.77 ± 4.82*	146.74 ± 3.91	169.79 ± 5.19†
14	135.97 ± 4.56*	180.74 ± 5.56	195.91 ± 3.31
15	135.91 ± 3.36*	182.39 ± 5.10	143.42 ± 5.13†
16	135.45 ± 2.21*	188.83 ± 4.52	136.63 ± 3.27†
17	Fehlend°	159.33 ± 4.25°	141.68 ± 5.98†°
18	131.68 ± 3.11*°	157.46 ± 5.79	140.03 ± 3.72†
19	126.83 ± 2.32*	154.46 ± 8.17	138.25 ± 2.61†
20	120.72 ± 3.26*	152.60 ± 10.51	134.19 ± 2.90†

**Tab. 15 – Telemetrie: diastolische arterielle Blutdruck (Tag 1 – 20)**

Der DBP wurde von Tag 1 bis 20 mit Hilfe eines Telemetriesenders aufgezeichnet und war am Tag 13 bei PE + Peptid Tieren im Gegensatz zu den PE-Tieren signifikant erhöht. WT-Tiere und PE + Peptid wiesen im Vergleich zu den PE-Tieren von Tag 15 – 20 signifikant erniedrigte Werte auf. Alle Werte sind als Mittelwert ± SEM angegeben. SEM = Standardfehler, WT Vehikel = Wildtyp-Kontrollgruppe (n = 5), PE Vehikel = Präeklampsiegruppe (n = 6), PE + Peptid = mit dem Peptid-Antagonisten behandelte Präeklampsie-gruppe (n = 7). ° Fehlende Daten: An Tag 17 und/oder 18 war eine telemetrische Aufzeichnung nicht möglich, da die Tiere 24 Stunden lang in metabolischen Käfigen gehalten wurden, um Urin zu sammeln. Repeated measurement two-way ANOVA, \*WT vs. PE: signifikant (p < 0,05), † PE vs. PE + Peptid: signifikant (p < 0,05).

Tag	WT	PE	PE + Peptid
1	90.63 ± 4.62	89.15 ± 5.91	89.36 ± 1.66
2	90.28 ± 3.58	85.70 ± 4.29	90.51 ± 2.22
3	86.51 ± 5.41	84.96 ± 4.33	89.70 ± 2.06

4	81.45 ± 9.65	83.88 ± 4.52	89.13 ± 1.94
5	79.39 ± 13.04	81.44 ± 3.71	89.36 ± 2.86
6	79.08 ± 13.24	80.68 ± 4.38	89.71 ± 3.34
7	79.05 ± 12.71	82.41 ± 4.14	89.30 ± 2.56
8	80.76 ± 13.37	83.64 ± 3.62	89.86 ± 3.30
9	84.87 ± 14.21	84.84 ± 3.68	88.65 ± 2.80
10	82.45 ± 13.34	85.62 ± 4.47	86.98 ± 2.90
11	80.11 ± 13.66	82.00 ± 3.81	85.69 ± 2.11
12	79.25 ± 14.44	81.38 ± 4.79	90.03 ± 3.17
13	78.10 ± 14.47	103.02 ± 4.72	120.83 ± 3.87†
14	79.97 ± 15.18*	137.04 ± 4.22	148.98 ± 2.43
15	78.09 ± 14.90*	137.60 ± 3.71	90.96 ± 6.15†
16	76.80 ± 14.32*	138.35 ± 4.03	85.31 ± 2.76†
17	Fehlend°	115.66 ± 5.31°	89.75 ± 5.91†°
18	89.30 ± 4.07*°	108.24 ± 6.92	88.14 ± 3.46†
19	72.80 ± 12.47*	103.64 ± 9.14	87.00 ± 1.70†
20	69.12 ± 11.54*	103.88 ± 11.24	82.41 ± 2.21†

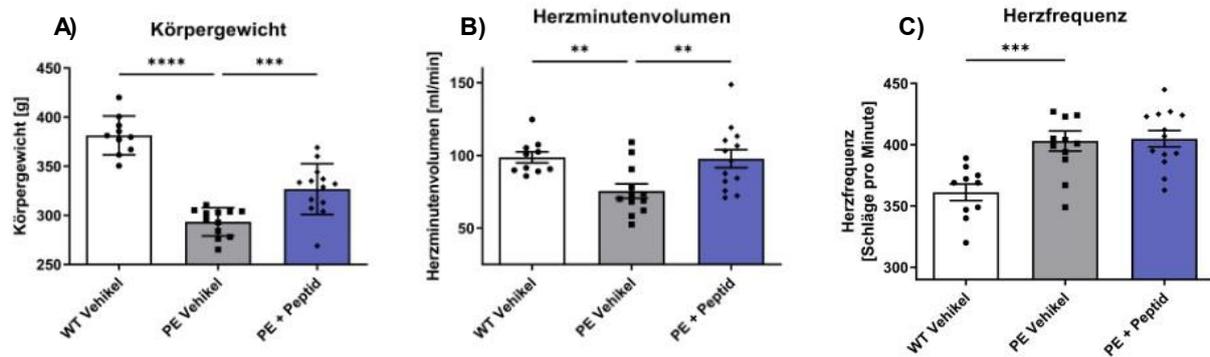
## 5.2. Basisparameter

WT und PE + Peptid wiesen im Gegensatz zu PE ein erhöhtes Körpergewicht (Abb. 7 A: WT 381,5 ± 6,28 vs. PE 293,4 ± 4,12 p < 0,0001; PE 293,4 ± 4,12 vs. PE + Peptid 326,8 ± 25,81 p = 0,0007) und ein erhöhtes Herzzeitvolumen auf (Abb. 7 B: WT 98,71 ± 3,75 vs. PE 75,52 ± 4,94, p = 0,01; PE 75,52 ± 4,94 vs. PE + Peptid 97,74 ± 6,17, p = 0,008). Beim Vergleich von PE mit WT konnte bei PE eine erhöhte Herzfrequenz festgestellt werden (Abb. 7 C: WT 361,2 ± 6,78 vs. PE 403,1 ± 8,15 p = 0,0008). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Herzfrequenz zwischen PE und PE + Peptid (Abb. 7 C: PE 403,1 ± 8,15 vs. PE + Peptid 404,9 ± 6,63, p = 0,98)

### Abb. 7 – Basisparameter: Körpergewicht, Herzzeitvolumen und Herzfrequenz

Das Körpergewicht war in der gesunden Kontrollgruppe und in den Tieren, die mit dem Peptid-Antagonisten behandelt wurden, signifikant erhöht (A). Weiterhin wiesen beide Gruppen im Vergleich zu PE-Tieren ein erhöhtes Herzzeitvolumen auf (B). Bei PE-Tieren konnte zudem eine erhöhte Herzfrequenz im Vergleich zu WT-Tieren nachgewiesen werden. Alle Werte sind als Mittelwert ± SEM angegeben. SEM = Standardfehler, WT Vehikel = Wildtyp-Kontrollgruppe (n = 10), PE Vehikel =

Präeklampsiegruppe (n = 12), PE + Peptid = mit dem Peptid-Antagonisten behandelte Präeklampsiegruppe (n = 13), One-way ANOVA \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001.

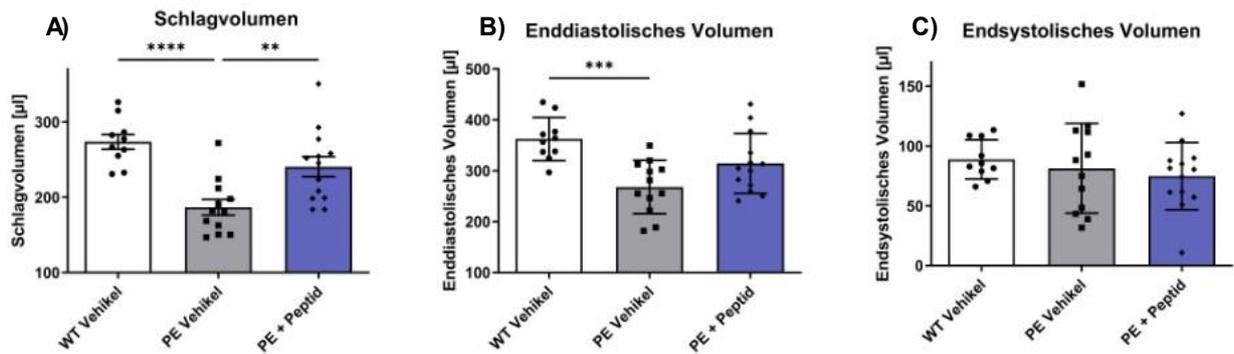


### 5.3. Echokardiographische Parameter

Das Schlagvolumen (SV) war bei PE im Vergleich zu WT signifikant erniedrigt (Abb. 8 A: WT  $273,7 \pm 9,87$  vs. PE  $186,7 \pm 10,53$  p < 0,0001). Durch Behandlung mit dem Peptid-Antagonisten konnte eine Normalisierung des SV beobachtet werden (Abb. 8A: PE  $186,7 \pm 10,53$  vs. PE + Peptid  $240,6 \pm 13,43$ , p = 0,004). Für das enddiastolische Volumen konnten signifikant erniedrigte Werte bei PE im Vergleich zu WT nachgewiesen werden (Abb. 8 B: WT  $362,4 \pm 13,46$  vs. PE  $268 \pm 15,13$ , p = 0,0004). Darüber hinaus bestand eine Tendenz zu einem erhöhten enddiastolischen Volumen bei PE + Peptid im Vergleich zu PE (Abb. 8 B: PE  $268 \pm 15,13$  vs. PE + Peptid  $314,4 \pm 16,36$ , p = 0,06), die im t-Test und somit im alleinigen Vergleich beider Gruppen eine Signifikanz erreichte (PE vs. PE + Peptid, p = 0,05). Beim Vergleich zwischen WT und PE sowie PE + Peptid und PE wurden keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf das endsystolische Volumen festgestellt (Abb. 8 C: WT  $88,73 \pm 5,21$  vs. PE  $81,29 \pm 10,82$ , p = 0,78; PE  $81,29 \pm 10,82$  vs. PE + Peptid  $74,78 \pm 7,80$ , p = 0,8).

#### Abb. 8 – Echokardiographische Parameter (1): Schlagvolumen, enddiastolisches und endsystolisches Volumen

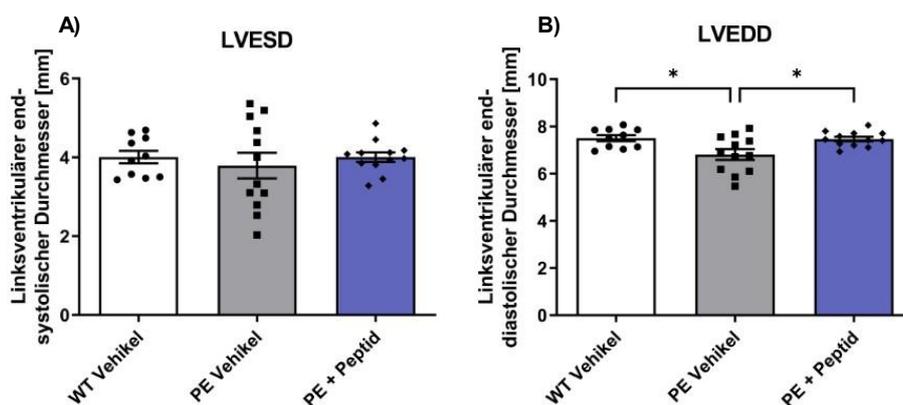
PE-Tiere wiesen ein verringertes Schlagvolumen (A) und enddiastolisches Volumen (B) auf. Für das endsystolische Volumen (C) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen allen drei Gruppen festgestellt werden. Alle Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. SEM = Standardfehler WT Vehikel = Wildtyp-Kontrollgruppe (n = 10), PE Vehikel = Präeklampsiegruppe (n = 12), PE + Peptid = mit dem Peptid-Antagonisten behandelte Präeklampsiegruppe (n = 13), One-way ANOVA \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001.



Es konnten endsystolisch keine signifikanten Unterschiede für den linksventrikulären Durchmesser (LVESD) zwischen WT und PE bzw. PE und PE + Peptid gezeigt werden (Abb. 9 A: WT  $4,01 \pm 0,16$  vs. PE  $3,79 \pm 0,33$ ,  $p = 0,74$ ; PE  $3,79 \pm 0,33$  vs. PE + Peptid  $4,01 \pm 0,12$ ,  $p = 0,72$ ). Enddiastolisch hingegen konnten bei PE im Vergleich zu WT erniedrigte Werte für den linksventrikulären Durchmesser (LVEDD) nachgewiesen werden (Abb. 9 B: WT  $7,51 \pm 0,13$  vs. PE  $6,81 \pm 0,22$ ,  $p = 0,01$ ). Nach Behandlung mit dem Peptid-Antagonisten zeigte sich bei PE + Peptid im Vergleich zu PE ein signifikanter Anstieg des LVEDD (Abb. 9B:  $6,81 \pm 0,22$  vs. PE + Peptid  $7,47 \pm 0,09$ ,  $p = 0,01$ ).

#### Abb. 9 – Echokardiographische Parameter (2): linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser systolisch und diastolisch

Es zeigten sich im Vergleich zu PE-Tieren keine signifikanten Unterschiede für den linksventrikulären endsystolischen Durchmesser (LVESD) (A). Bei PE-Tieren konnte im Vergleich zu WT-Tieren ein erniedrigter LVEDD nachgewiesen werden, welcher wiederum nach Behandlung mit dem Peptid-Antagonisten bei PE + Peptid im Vergleich zu PE signifikant erhöht war (B). Alle Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. SEM = Standardfehler, WT Vehikel = Wildtyp-Kontrollgruppe ( $n = 10$ ), PE Vehikel = Präeklampsiegruppe ( $n = 12$ ), PE + Peptid = mit dem Peptid-Antagonisten behandelte Präeklampsiegruppe ( $n = 13$ ), LVESD = linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser, LVEDD = linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser, One-way ANOVA \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$



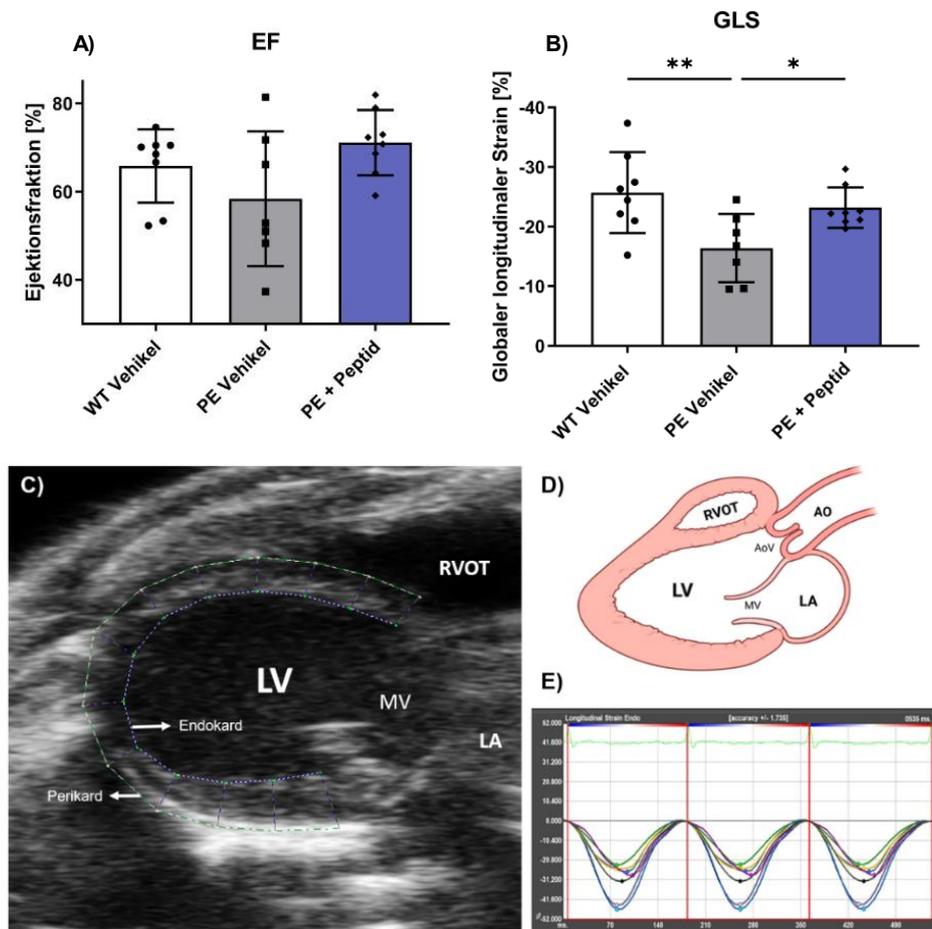
#### 5.4. Speckle-Tracking Echokardiographie

Die EF unterschied sich beim Vergleich von WT bzw. PE + Peptid mit PE nicht signifikant (Abb. 10 A; WT  $65,8 \pm 2,94$  vs. PE  $58,39 \pm 5,77$ ,  $p = 0,75$ , PE  $58,39 \pm 5,77$  vs. PE + Peptid  $71,1 \pm 2,61$ ,  $p = 0,09$ ), wobei PE + Peptid im Gegensatz zu PE tendenziell erhöhte Werte aufwies. Mit Hilfe der Speckle-Tracking Echokardiographie konnte über den longitudinalen Strain die Myokardverformung global und regional gemessen und damit die kontraktile Funktion bestimmt werden. Global wurden für den longitudinalen Strain erhöhte negative Werte für WT-Tiere und PE + Peptid Tiere nachgewiesen (Abb. 10 B: WT  $-25,71 \pm 2,4$  vs. PE  $-16,39 \pm 2,16$ ,  $p = 0,007$ ; PE  $-16,39 \pm 2,16$  vs. PE + Peptid  $-23,18 \pm 1,20$   $p = 0,05$ ).

#### **Abb. 10 – Speckle-Tracking Echokardiographie: Ejektionsfraktion und globaler longitudinaler Strain**

Beim Vergleich mit PE-Tieren zeigten sich keine signifikanten Unterschiede für die EF (A). WT-Tiere und PE + Peptid Tiere wiesen im Vergleich zu PE-Tieren höhere negative Werte für den GLS auf (B). Um die EF und den GLS zu erfassen, erfolgten die Messungen echokardiographisch im B-Mode in der parasternalen langen Achse (C, D). Bei der Analyse wurden zweidimensionale Graustufenbilder verwendet und sowohl die globale als auch die regionale LV-Funktion (s. Abb. 11) beurteilt. Für die Berechnung des GLS wurde das Endokard des linken Ventrikels manuell in der in der enddiastolischen Phase markiert. Der Messwert der myokardialen Deformation ergibt sich aus dem Mittelwert der sechs einzelnen Segmente des LV (s. Abb 11 C). Das Epikard wurde durch die Software automatisch erfasst und bei Bedarf manuell an die Wanddicke angepasst. Zur Erfassung der GLS wurden drei aufeinanderfolgende Herzzyklen erfasst (E) und für jede Aufnahme wiederum der Mittelwert aus drei Messungen berechnet wurden. Alle Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. SEM = Standardfehler, WT Vehikel = Wildtyp-Kontrollgruppe ( $n = 8$ ), PE Vehikel = Präeklampsiegruppe ( $n = 7$ ), PE + Peptid = mit dem Peptid-Antagonisten behandelte Präeklampsiegruppe ( $n = 8$ ), LV = Linker Ventrikel, LA = linker Vorhof, RVOT = rechtsventrikulärer Ausflusstrakt, AO = Aorta, AoV = Aortenklappe, MV = Mitralklappe. EF: Kruskal-Wallis Test, GLS: One-way ANOVA; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ . Figure D was created by BioRender.com.

## Speckle-Tracking Echokardiographie: EF und GLS



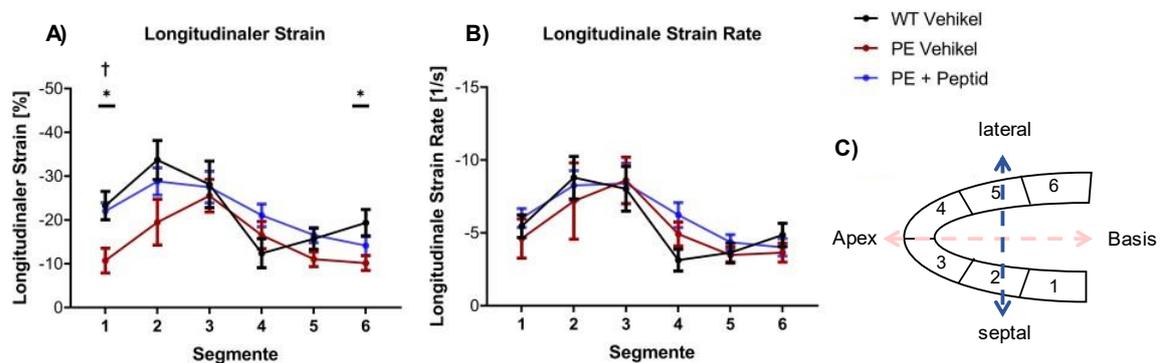
Regional betrachtet zeigten sich im basoseptalen Abschnitt (Segment 1) des linken Ventrikels signifikant erniedrigte Werte für den longitudinalen Strain in WT-Tieren sowie PE + Peptid Tieren im Vergleich zu PE-Tieren (Abb. 11 A: WT  $23,28 \pm 3,23$  vs. PE  $-10,73 \pm 2,82$ ,  $p = 0,02$ , PE  $-10,73 \pm 2,82$  vs. PE + Peptid  $-22,01 \pm 1,93$ ,  $p = 0,03$ ). Im Unterschied zu PE-Tieren zeigten WT-Tiere weiterhin auch im basolateralen Segment (Segment 6) erhöhte negative Werte auf (Abb. 11 A: Segment 6 WT  $-19,34 \pm 3,06$  vs.  $-10,17 \pm 1,7$ ,  $p = 0,04$ ). Für die apikalen und lateralen Anteile (Segment 2 - 5) konnten keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich mit PE-Tieren festgestellt werden (Tab. 8). Gleiches gilt für die longitudinale Strain-Rate für die Segmente 1-6, in denen keine signifikanten Unterschiede verglichen mit PE-Tieren nachgewiesen wurden (Abb. 11 B, Tab. 9).

### Abb. 11 – Speckle-Tracking-Echokardiographie: regionale Analyse (longitudinaler Strain und longitudinale Strain-Rate)

Bei WT-Tieren (schwarze Linie) und PE + Peptid Tieren (blaue Linie) waren im Unterschied zu PE-Tieren (rote Linie) erhöhte negative Werte für den longitudinalen Strain im Segment 1 nachweisbar, bei

WT-Tieren weiterhin auch im Segment 6 (A). Beim Vergleich mit PE-Tieren zeigten sich keine signifikanten Unterschiede für die longitudinale Strain-Rate in den Segmenten 1 - 6 (B). In C werden die Segmente 1 - 6 in der langen Achse des linken Ventrikels dargestellt. Die Segmente 1 - 2 entsprechen den septalen, 3 - 4 den apikalen und 5 - 6 den lateralen Anteilen. Alle Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. SEM = Standardfehler, WT Vehikel = Wildtyp-Kontrollgruppe (n = 8), PE Vehikel = Präeklampsiegruppe (n = 7), PE + Peptid = mit dem Peptid-Antagonisten behandelte Präeklampsiegruppe (n = 8). Repeated measurement two-way ANOVA, \*WT vs. PE: signifikant ( $p < 0,05$ ), † PE vs. PE + Peptid: signifikant ( $p < 0,05$ ).

### Speckle-Tracking-Echokardiographie : regionale Analyse



**Tab. 16 – Speckle-Tracking-Echokardiographie: Longitudinaler Strain**

Der longitudinale Strain wurde mittels Speckle-Tracking-Echokardiographie bestimmt. Beim Vergleich mit der präeklampsischen Gruppe konnten signifikant höher negative Werte für WT und PE + Peptid im Segment 1 bzw. für WT-Tiere auch im Segment 6 nachgewiesen werden. Alle Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. SEM = Standardfehler, WT = Wildtyp-Kontrollgruppe (n = 8), PE = Präeklampsiegruppe (n = 7), PE + Peptid = mit dem Peptid-Antagonisten behandelte Präeklampsiegruppe (n = 8). Repeated measurement two-way ANOVA, \*WT vs. PE: signifikant ( $p < 0,05$ ), † PE vs. PE + Peptid: signifikant ( $p < 0,05$ ).

Segment	WT	PE	PE + Peptid
1	-23,28 $\pm$ 3,23*	-10,73 $\pm$ 2,82	-22,01 $\pm$ 1,93†
2	-33,69 $\pm$ 4,47	-19,49 $\pm$ 5,24	-28,79 $\pm$ 3,1
3	-28,12 $\pm$ 5,3	-25,53 $\pm$ 3,73	-27,5 $\pm$ 3,6
4	-12,41 $\pm$ 3,31	-16,53 $\pm$ 3,09	-21,04 $\pm$ 2,61
5	-15,71 $\pm$ 2,41	-11,06 $\pm$ 1,69	-16,55 $\pm$ 1,72
6	-19,34 $\pm$ 3,06*	-10,17 $\pm$ 1,7	-14,16 $\pm$ 2,27

**Tab. 17 – Speckle-Tracking-Echokardiographie: Longitudinale Strain-Rate**

Die longitudinale Strain-Rate wird ebenfalls über die Speckle-Tracking-Echokardiographie gemessen. In allen sechs Segmenten bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen PE und WT bzw. PE und PE + Peptid. Alle Werte sind als Mittelwert ± SEM angegeben. SEM = Standardfehler, WT = Wildtyp-Kontrollgruppe (n = 8), PE = Präeklampsiegruppe (n = 7), PE + Peptid = mit dem Peptid-Antagonisten behandelte Präeklampsiegruppe (n = 8). Repeated measurement two-way ANOVA, \*WT vs. PE: signifikant (p < 0,05), † PE vs. PE + Peptid: signifikant (p < 0,05).

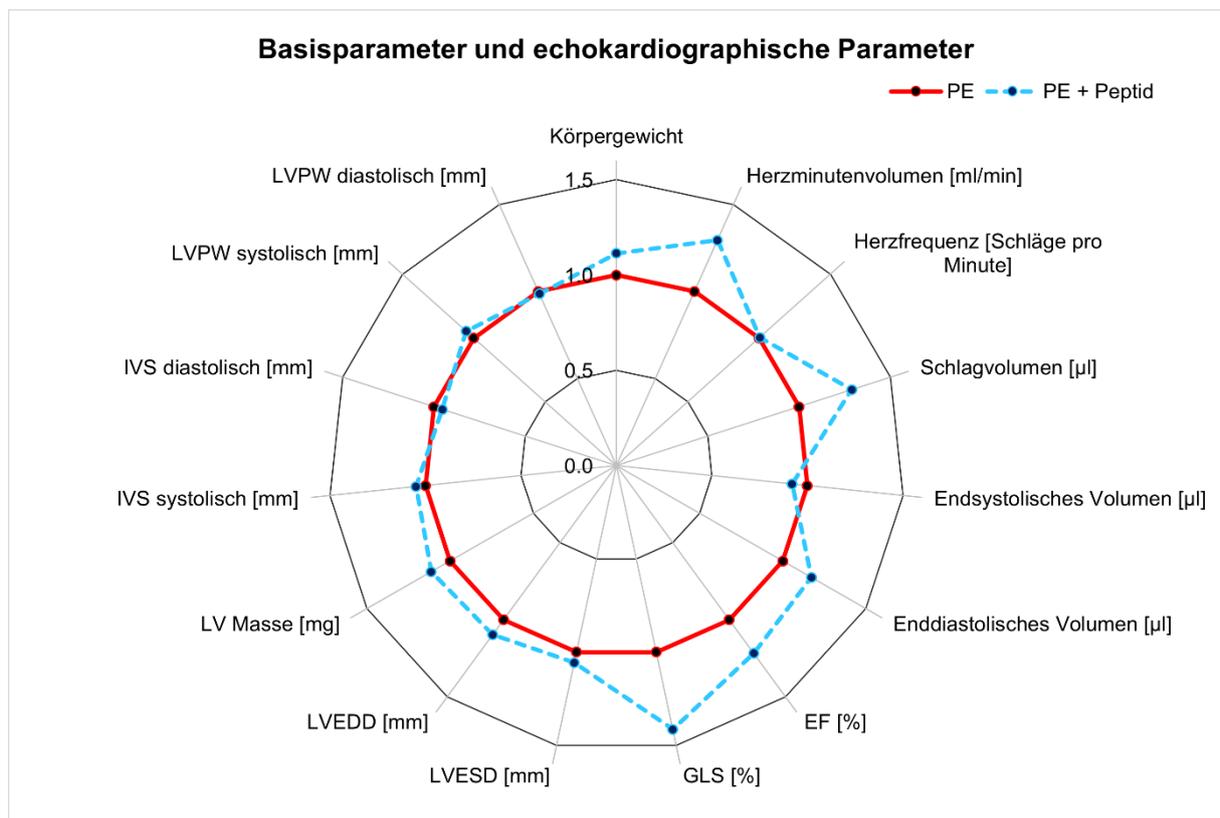
Segment	WT	PE	PE + Peptid
1	-5,46 ± 0,77	-4,62 ± 1,34	-6,02 ± 0,65
2	-8,79 ± 1,46	-7,19 ± 2,62	-8,25 ± 1,01
3	-8,02 ± 1,53	-8,61 ± 1,59	-8,39 ± 1,39
4	-3,13 ± 0,75	-4,92 ± 0,82	-6,23 ± 0,86
5	-3,64 ± 0,65	-3,48 ± 0,55	-4,35 ± 0,53
6	-4,86 ± 0,8	-3,64 ± 0,65	-4,01 ± 0,6

In der Abbildung 12 ist eine zusammenfassende Darstellung der Basisparameter, der echokardiographischen Parameter und der Ergebnisse der Speckle-Tracking-Echokardiographie (EF, GLS) zwischen PE und PE + Peptid Tieren in Form eines Spiderplots dargestellt. Die Messwerte von PE wurden normalisiert (rote Linie), so dass die Parameter der PE + Peptid-Tiere als relative Werte (blaue Linie) abgebildet sind. Weitere echokardiographische Parameter, die im Rahmen dieser Dissertation ausgewertet wurden und im Spiderplot zu sehen sind, sind die LV-Masse, die IVS (interventrikuläre Septumdicke) systolisch und diastolisch sowie die LVPW (linksventrikuläre posteriore Wand) systolisch und diastolisch. Für diese Messwerte wurden keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich mit PE-Tieren festgestellt. Die absoluten Werte sind in der Tabelle 10 angegeben.

**Abb. 12 – Spiderplot: Vergleich von Basisparameter und echokardiographischen Parametern zwischen PE und PE + Peptid Tieren**

Im Spiderplot wurden die Mittelwerte von Basisparametern und echokardiographischen Parameter von PE-Tieren mit PE + Peptid Tieren verglichen. Die Messwerte von PE-Tieren wurden dabei normalisiert (rote Linie). Parameter von PE + Peptid Tieren wurden als relative Werte dargestellt (blaue Linie). PE + Peptid Tiere zeigten an Tag 21 ein signifikant erhöhtes Körpergewicht im Vergleich zu PE-Tieren.

Weiterhin wiesen die mit dem Peptid-Antagonisten behandelten Tiere ein signifikant erhöhtes Schlagvolumen, Herzzeitvolumen und diastolisches Volumen auf. Während die Ejektionsfraktion keine signifikanten Unterschiede zwischen PE und PE + Peptid Tieren zeigte, konnten für den GLS erhöhte negative Werte bei PE + Peptid nachgewiesen werden. Auch für den LVEDD konnten signifikant höhere Werte bei PE + Peptid Tieren festgestellt werden. LV = Linker Ventrikel/ linksventrikulär, EF = Ejektionsfraktion, GLS = Globaler longitudinaler Strain, LVESD = linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser, LVEDD = linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser, IVS = interventrikuläre Septumdicke, LVPW = linksventrikuläre posteriore Wand; PE = Präeklampsiegruppe, PE + Peptid = mit dem Peptid-Antagonisten behandelte Präeklampsiegruppe.



**Tab. 18 – Basisparameter und echokardiographische Parameter**

Die Tabelle zeigt die Messwerte der Basisparameter sowie verschiedener echokardiographischer Parameter. Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben. SEM = Standardfehler LV = Linker Ventrikel/ linksventrikulär, EF = Ejektionsfraktion, GLS = Globaler longitudinaler Strain, LVESD = linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser, LVEDD = linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser, IVS = interventrikuläre Septumdicke, LVPW = linksventrikuläre posteriore Wand, WT = Wildtyp-Kontrollgruppe (n = 10), PE = Präeklampsiegruppe (n = 12), PE + Peptid = mit dem Peptid-Antagonisten behandelte Präeklampsiegruppe (n = 13; LVESD, LVEDD, LVPW d, IVS syst/d: n = 12, LVPW syst: n = 11). One-ANOVA, \*WT vs. PE: signifikant ( $p < 0,05$ ), † PE vs. PE + Peptid: signifikant ( $p < 0,05$ ).

	WT	PE	PE + Peptid
Körpergewicht	381,5 ± 6,28*	PE 293,4 ± 4,12	326,8 ± 25,81
LV-Masse [mg]	782,0 ± 43,93	744,4 ± 45,33	829,4 ± 28,06
Herzfrequenz	361,2 ± 6,78*	403,1 ± 8,15	404,9 ± 6,63
Schlagvolumen	273,7 ± 9,87*	186,7 ± 10,53	240,6 ± 13,43†
Herzminutenvolumen	98,71 ± 3,75*	75,52 ± 4,94	97,74 ± 6,17†
Systolisches Volumen [μl]	88,73 ± 5,21	81,29 ± 10,82	74,78 ± 7,8
Diastolisches Volumen [μl]	362,4 ± 13,46*	268 ± 15,13	314,4 ± 16,36
LVESD [mm]	4,01 ± 0,16	3,79 ± 0,33	4,01 ± 0,12
LVEDD [mm]	7,51 ± 0,13*	6,81 ± 0,22	7,47 ± 0,09†
IVS systolisch [mm]	2,51 ± 0,06	2,48 ± 0,55	2,61 ± 0,09
IVS diastolisch [mm]	1,5 ± 0,04	1,61 ± 0,06	1,53 ± 0,05
LVPW systolisch [mm]	2,58 ± 0,06	2,65 ± 0,11	2,8 ± 0,06
LVPW diastolisch [mm]	1,5 ± 0,06	1,65 ± 0,07	1,63 ± 0,06

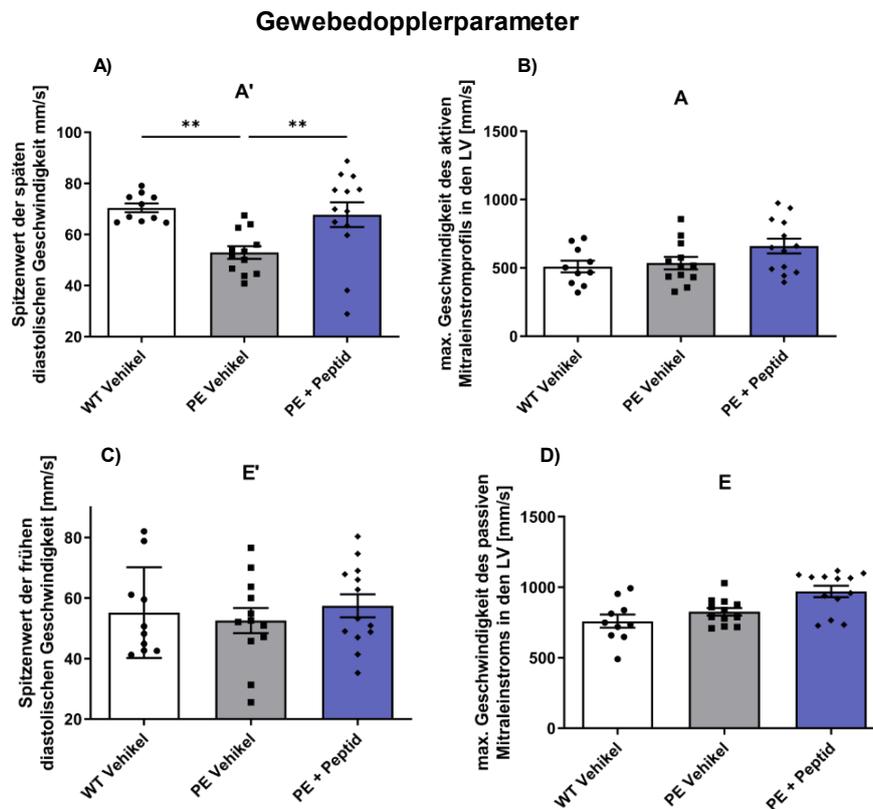
## 5.5. Gewebedopplerparameter

Die Gewebedopplerwerte zeigten keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich mit PE-Tieren (Tab. 11). Gleiches gilt auch für die jeweiligen Quotientenwerte (Tab. 11). Einzig für die frühdiastolische, aktive Mitralanulusgeschwindigkeit konnten erhöhte Werte sowohl bei WT-Tieren als auch PE + Peptid Tieren im Unterschied zu PE-Tieren nachgewiesen werden (Abb. 13 A; WT  $70,46 \pm 1,73$  vs. PE  $52,96 \pm 2,44$ ,  $p = 0,004$ ; PE  $52,96 \pm 2,44$  vs. PE + Peptid,  $p = 0,009$ ).

### Abb. 13 – Gewebedopplerparameter

WT-Tiere und PE + Peptid Tiere zeigten beim Vergleich zu PE-Tieren eine signifikant verringerte frühdiastolische, aktive Mitralanulusgeschwindigkeit A' (A). Für die weiteren Gewebedopplerparameter konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (B, C, D). Alle Werte sind als Mittelwert ± SEM angegeben. SEM = Standardfehler, WT Vehikel = Wildtyp-Kontrollgruppe (n = 10), PE Vehikel = Präeklampsiegruppe (n = 12), PE + Peptid = mit dem Peptid-Antagonisten behandelte Präeklampsie-

gruppe (n = 13). Zur Berechnung der p-Werte von A wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Mit Hilfe des One-way ANOVA wurden die p-Werte von E, E' und A' berechnet. \*p<0,05, \*\*p<0,01



**Tab. 19 – Gewebedopplerparameter**

WT und PE + Peptid wiesen im Vergleich zu PE eine signifikant verringerte frühdiaastolische, aktive Mitralanulusgeschwindigkeit A'. Für die weiteren Gewebedopplerparameter sowie ihre Quotientenwerte konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (p > 0,05). Alle Werte sind als Mittelwert ± SEM angegeben. SEM = Standardfehler, WT Vehikel = Wildtyp-Kontrollgruppe (n = 10), PE Vehikel = Präeklampsiegruppe (n = 12), PE + Peptid = mit dem Peptid-Antagonisten behandelte Präeklampsiegruppe (n = 13). Der Kruskal-Wallis-Test wurde zur Berechnung der p-Werte von A und E/A verwendet. Mit Hilfe des One-way ANOVA wurden die p-Werte von E, E', E/E', E/A' und A' berechnet. \*WT vs. PE: signifikant (p < 0,05), † PE vs. PE + Peptid: signifikant (p < 0,05).

Dopplerparameter	WT	PE	PE + Peptid
A	510 ± 43,56	535,1 ± 45,34	659,5 ± 54,1
A'	70,46 ± 1,73*	52,96 ± 2,44	67,77 ± 4,86†
E	759,9 ± 46,99	826,4 ± 27,16	971,1 ± 40,05
E'	55,17 ± 4,74	52,55 ± 4,19	57,41 ± 3,78

E/A	1,52 ± 0,06	1,63 ± 0,11	1,55 ± 0,09
E'/E'	14,35 ± 1,13	17,04 ± 1,64	17,5 ± 0,94
E/A'	0,79 ± 0,08	1,01 ± 0,09	0,92 ± 0,1

## 5.6. Immunhistologische Ergebnisse

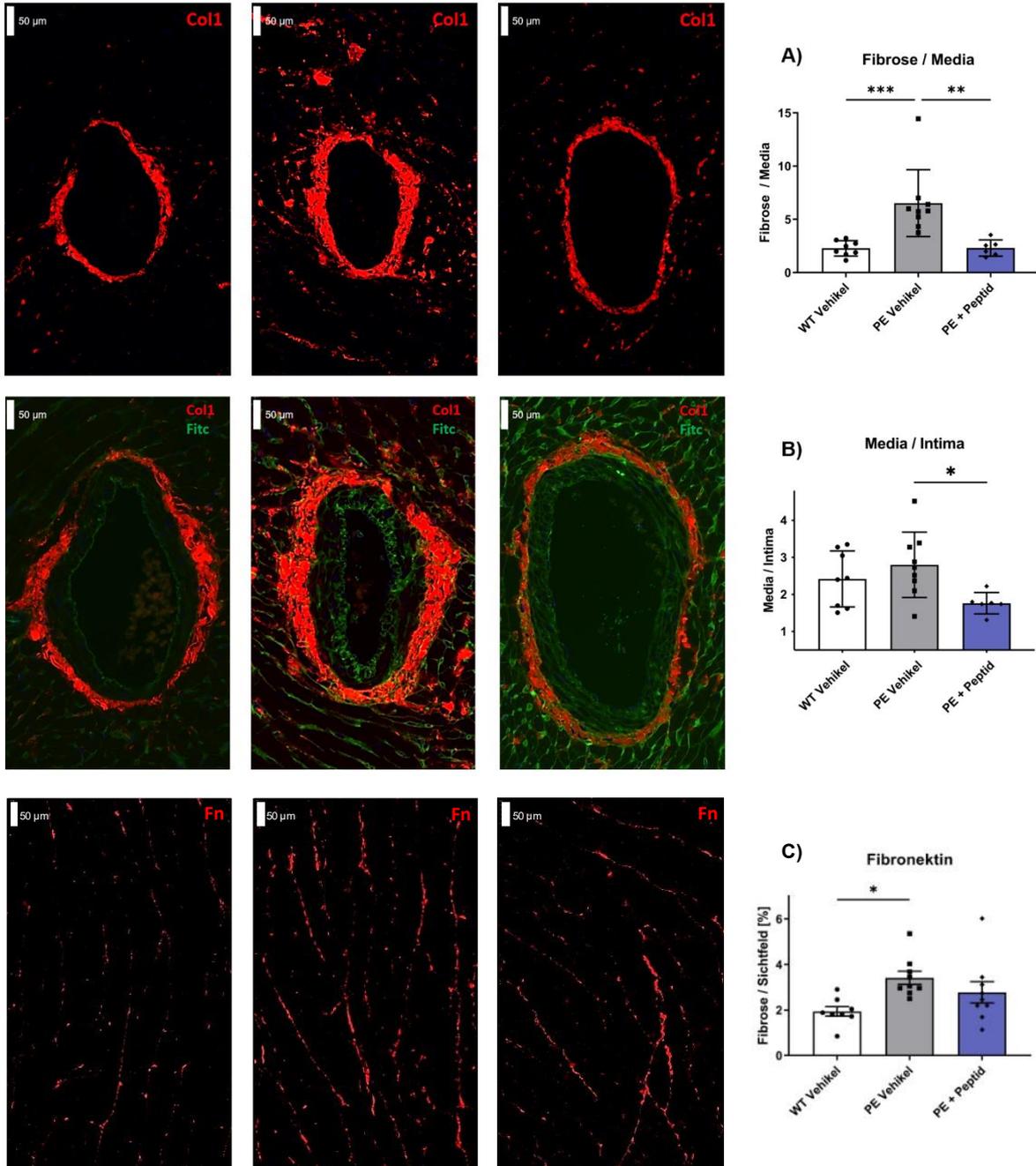
Die Ergebnisse der immunhistologischen Färbungen von PE-Tieren wurden mit den Werten von WT-Tieren sowie PE + Peptid Tieren des gleichen Rattenstamms verglichen. Die Färbungen konnten zeigen, dass PE an Tag 21 der Schwangerschaft im Vergleich zu WT eine signifikant erhöhte perivaskuläre (Abb. 14 A; WT  $2,28 \pm 0,25$  vs. PE  $6,52 \pm 0,38$ ,  $p = 0,0008$ ) und interstitielle Fibrose (Abb. 14 C; WT  $1,94 \pm 0,21$  vs. PE  $3,41 \pm 0,29$ ,  $p = 0,01$ ) aufwies. Die Behandlung mit dem Peptid-Antagonisten führte bei PE-Tieren zu einer Verringerung der perivaskulären Fibrose (Abb. 14 A; PE  $6,52 \pm 0,38$  vs. PE + Peptid  $2,305 \pm 2,31 \pm 0,31$ ,  $p = 0,002$ ) und der Media-Dicke (PE  $2,8 \pm 0,29$  vs. PE + Peptid  $1,76 \pm 0,12$ ,  $p = 0,03$ ). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen PE-Tieren und WT-Tieren bezüglich der Media-Dicke (Abb. 14 B; WT  $2,42 \pm 0,27$  vs. PE  $2,8 \pm 0,29$ ,  $p = 0,47$ ). Eine Behandlung mit dem Peptid-Antagonisten bei PE-Tieren zeigte keinen Einfluss auf die interstitielle Fibrose (Abb. 14 C; PE  $3,41 \pm 0,29$  vs. PE + Peptid  $2,77 \pm 0,47$ ,  $p = 0,33$ ).

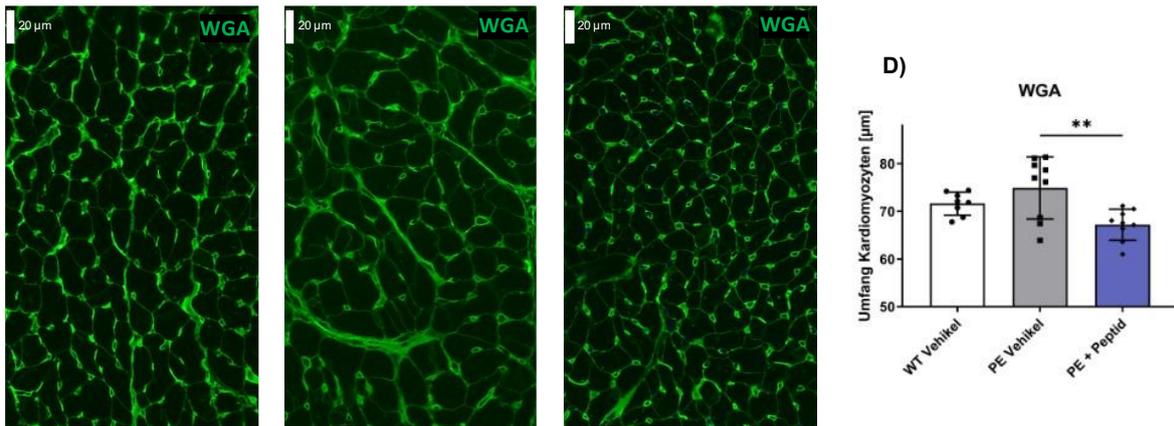
In der Weizenkeim Agglutinin Färbung wurde die Zellmembran von Kardiomyozyten gefärbt und ihr Umfang zur Quantifizierung der Hypertrophie verglichen. PE + Peptid Tiere wiesen einen signifikant verringerten Umfang der Kardiomyozyten im Vergleich zu PE-Tieren auf (Abb. 14 D; PE  $79 \pm 0,87$  vs. PE + Peptid  $67,2 \pm 1,08$ ,  $p < 0,003$ ). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen WT- und PE-Tieren (Abb. 14 D; WT  $71,64 \pm 0,86$  vs. PE  $79 \pm 0,87$ ,  $p = 0,25$ ) in Bezug auf den Kardiomyozyten-Umfang.

### Abb. 14 – Quantitative Proteinanalyse mittels immunhistologischer Färbungen

PE-Tiere zeigten am Ende der Schwangerschaft (d21) gegenüber WT-Tieren eine signifikant erhöhte perivaskuläre Fibrose in der Col1-Färbung (A). Nach Behandlung mit dem Peptid-Antagonisten wiesen PE + Peptid Tiere eine signifikant verringerte perivaskuläre Fibrose (A) sowie Media-Dicke (B) auf. Weiterhin konnte bei PE-Tieren und PE + Peptid Tieren im Vergleich zu WT-Tieren eine erhöhte interstitielle Fibrose (Fn-Färbung) nachgewiesen werden. In der Weizenkeim Agglutinin (WGA) Färbung

zeigten WT-Tiere und PE + Peptid Tiere einen verringerten Umfang der Kardiomyozyten (D). Alle Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Maßstabsbalken Col1 50  $\mu$ m, WGA 20  $\mu$ m, Fn 50  $\mu$ m. SEM = Standardfehler, WGA = wheat germ agglutinin, WT Vehikel = Wildtyp-Kontrollgruppe (n = 8), PE Vehikel = Präeklampsiegruppe (n = 9), PE + Peptid = mit dem Peptid-Antagonisten behandelte Präeklampsiegruppe (n = 9, Col1: n = 6). One-way ANOVA \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001.

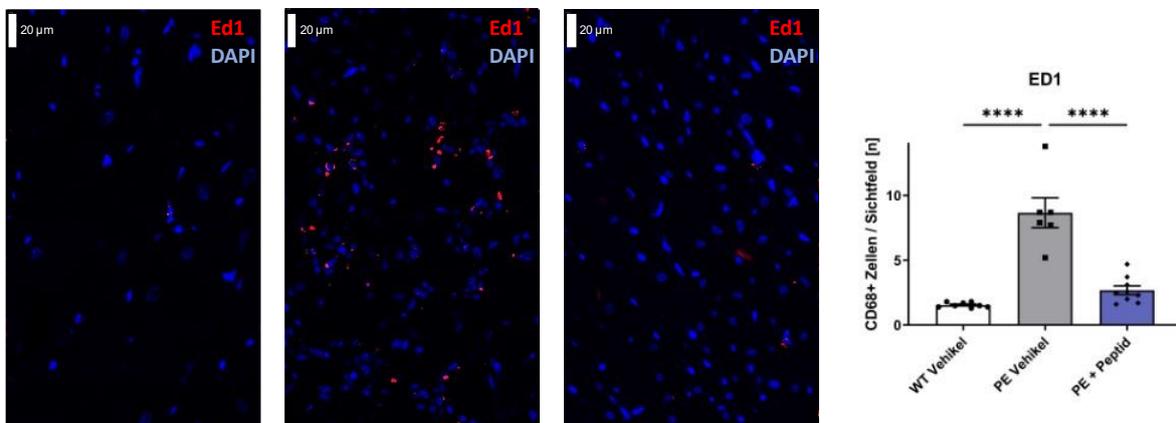




Inflammatorische Prozesse führen zur Einwanderung von Makrophagen ins Herzgewebe. Mit Hilfe der ED1 Färbung können diese CD68-positive Zellen (cluster of differentiation 68) markiert werden (Abb. 15). An Tag 21 der Schwangerschaft wies PE im Gegensatz zu WT einen signifikant erhöhten Anteil an Makrophagen im linken Ventrikel auf (Abb. 15; WT  $1,55 \pm 0,07$  vs. PE  $8,67 \pm 1,15$ ,  $p < 0,0001$ ), welcher nach Behandlung mit dem Peptid-Antagonisten bei PE + Peptid verglichen mit PE signifikant erniedrigt war (Abb. 15; PE  $8,67 \pm 1,15$  vs. PE + Peptid  $2,69 \pm 0,33$ ,  $p < 0,0001$ ).

#### Abb. 15 – ED1 Färbung zur Analyse inflammatorischer Vorgänge im linken Ventrikel

Am Ende der Schwangerschaft (d21) zeigten präeklampsischen Tieren eine signifikant erhöhte Anzahl von Makrophagen im Herzgewebe. Die Behandlung mit dem Peptid-Antagonisten führte zu einer signifikanten Verringerung von Makrophagen im linken Ventrikel. Alle Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Maßstabsbalken 20  $\mu\text{m}$ . SEM = Standardfehler, WT Vehikel = Wildtyp-Kontrollgruppe ( $n = 8$ ), PE Vehikel = Präeklampsiegruppe ( $n = 6$ ), PE + Peptid = mit dem Peptid-Antagonisten behandelte Präeklampsie-gruppe ( $n = 9$ ). One-way ANOVA \*\*\*\* $p < 0,0001$ .



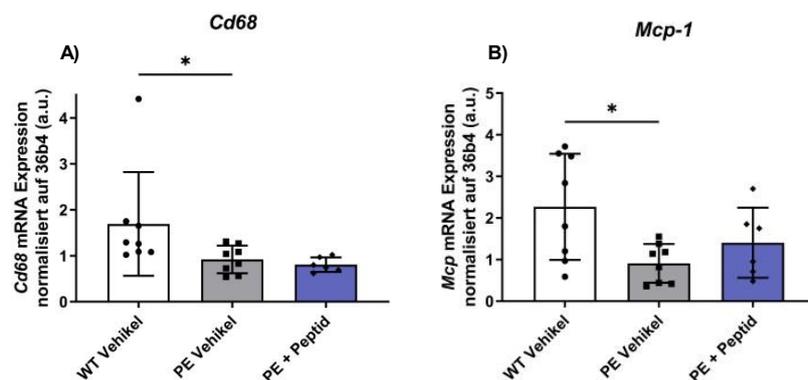
## 5.7. Genexpressionsanalyse und ELISA

Es erfolgte eine Genexpressionsanalyse der Herzspitze am letzten Tag der Schwangerschaft (d21). Die Genexpression von PE-Tieren wurde mit WT-Tieren, sowie PE + Peptid Tieren des gleichen Rattenstamms verglichen. Für die Genexpressionsanalyse wurde der Mittelwert in Relation zum housekeeping Gen *36b4* gebildet.

*Mcp-1* ist ein Chemokin, welches von vielen verschiedenen Zelltypen, darunter Endothelzellen, Monozyten und Adipozyten, als Reaktion auf Entzündungsreize produziert wird und zur Anlockung von Makrophagen und T-Zellen in Entzündungs-herde führt [101]. *CD68* ist im Gegensatz zu *Mcp-1* ein glykolysiertes Transmembranprotein, welches in Makrophagen und anderen mononukleären Phagozyten in hohem Maße exprimiert wird. Zum Ende der Schwangerschaft zeigte PE im Unterschied zu WT eine signifikant erniedrigte Genexpression von *Cd68* (Abb. 16 A; WT  $1,69 \pm 0,4$  vs. PE  $0,92 \pm 0,11$ ,  $p = 0,05$ ) sowie *Mcp-1* (Abb. 16 B; WT  $2,27 \pm 0,45$  vs. PE  $0,91 \pm 0,17$ ,  $p = 0,02$ ). PE + Peptid wiesen im Vergleich zu PE keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression von *Mcp-1* und *Cd68* auf (Abb. 16 A; *Mcp-1*:  $0,91 \pm 0,17$  vs. PE + Peptid  $1,41 \pm 0,34$ ,  $p = 0,53$ ; Abb. 16 B; *Cd68*: PE  $0,92 \pm 0,11$  vs. PE + Peptid  $0,81 \pm 0,06$ ,  $p = 0,75$ ).

### Abb. 16 – Genexpressionsanalyse von den Immunmarkern *Mcp-1* und *Cd68*

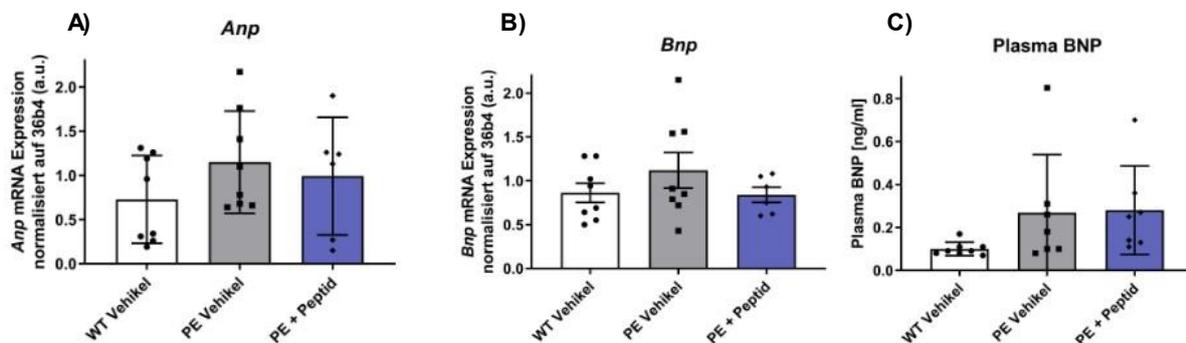
Bei PE konnte im Vergleich zu WT eine signifikant verringerte Genexpression für *Mcp-1* und *Cd68* nachgewiesen werden. Für beide Marker zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen PE und PE + Peptid. Alle Werte sind als  $\pm$  SEM angegeben. SEM = Standardfehler, WT Vehikel = Wildtyp-Kontrollgruppe ( $n = 8$ ), PE Vehikel = Präeklampsiegruppe ( $n = 8$ ), PE + Peptid = mit dem Peptid-Antagonisten behandelte Präeklampsiegruppe ( $n = 6$ ), a.u. = arbitrary units (willkürliche Einheiten). Der Kruskal-Wallis-Test wurde zur Berechnung der p-Werte von *Cd68* verwendet. Mit Hilfe des One-way ANOVA wurden die p-Werte von *Mcp-1* berechnet. \* $p < 0,05$ .



*Anp* und *BNP* werden bei myokardialer Dehnung freigesetzt und klinisch zur Diagnosestellung der Herzinsuffizienz verwendet [102]. WT-Tieren und PE + Peptid Tiere wiesen im Unterschied zu PE-Tieren keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression von *Anp* (Abb. 17 A; WT  $0,73 \pm 0,18$  vs. PE  $1,15 \pm 0,20$ ,  $p = 0,45$ ; PE  $1,15 \pm 0,20$  vs. PE + Peptid  $0,99 \pm 0,27$ ,  $p = 1$ ) und *BNP* (Abb. 17 B: WT  $0,86 \pm 0,11$  vs. PE  $1,12 \pm 0,20$ ,  $p = 0,37$ ; PE  $1,12 \pm 0,20$  vs. PE + Peptid  $0,84 \pm 0,09$ ,  $p = 0,37$ ) auf. Das Plasma-BNP hingegen war bei PE-Tieren im Vergleich zu WT-Tieren tendenziell erhöht, jedoch ohne eine Signifikanz zu erreichen (Abb. 17 C: WT  $0,1 \pm 0,01$  vs. PE  $0,27 \pm 0,04$ ,  $p = 0,1$ ). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen PE und PE + Peptid (Abb. 17 C; PE  $0,27 \pm 0,04$  vs. PE + Peptid  $0,28 \pm 0,08$ ,  $p = 0,87$ ).

#### Abb. 17 – Genexpressionsanalyse von *Anp/BNP*

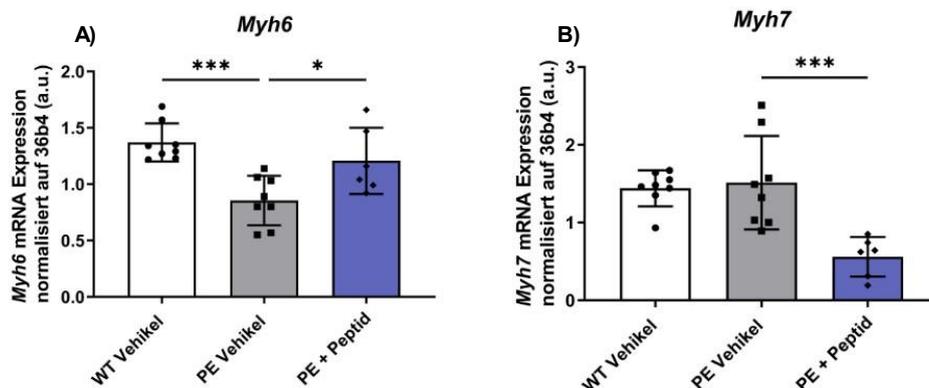
Es zeigten sich zwischen WT und PE bzw. PE und PE + Peptid keine signifikanten Unterschiede für die Genexpression von *Anp* (A) und *BNP* (B). Für das Plasma-BNP (C) konnten tendenziell erhöhte Werte in PE im Vergleich zu WT nachgewiesen werden. Alle Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. SEM = Standardfehler, WT Vehikel = Wildtyp-Kontrollgruppe ( $n = 8$ ), PE Vehikel = Präeklampsiegruppe ( $n = 8$ , Plasma-BNP:  $n = 7$ ), PE + Peptid = mit dem Peptid-Antagonisten behandelte Präeklampsiegruppe ( $n = 6$ , Plasma-BNP:  $n = 7$ ), a.u. = arbitrary units (willkürliche Einheiten). Der Kruskal-Wallis-Test wurde zur Berechnung der p-Werte von *Anp* und dem Plasma-BNP verwendet. Mit Hilfe des One-way ANOVA wurden die p-Werte von *BNP* berechnet.



PE-Tiere exprimierten das Gen *Myh6* (Protein:  $\alpha$ -MHC) im Unterschied zu WT-Tieren vermindert (Abb. 18 A; WT  $1,37 \pm 0,06$  vs. PE  $0,86 \pm 0,08$ ,  $p = 0,004$ ). In der mit dem Peptid-Antagonisten behandelten Gruppe (PE + Peptid) konnte im Vergleich zu PE sowohl eine erhöhte Genexpression von *Myh6* (Abb. 18 A:  $0,86 \pm 0,08$  vs. PE + Peptid  $1,21 \pm 0,12$ ,  $p = 0,02$ ) als auch verringerte Werte für *Myh7* (Abb. 18 B: PE  $1,51 \pm 0,21$  vs. PE + Peptid  $0,56 \pm 0,10$ ,  $p = 0,004$ ) nachgewiesen werden. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Genexpression von *Myh7* (Protein:  $\beta$ -MHC) zwischen WT und PE (Abb. 18 B; WT  $1,44 \pm 0,082$  vs. PE  $1,51 \pm 0,21$ ,  $p = 1$ ).

### Abb. 18 – Genexpressionsanalyse von *Myh6* und *Myh7*

Die Genexpressionsanalyse für *Myh6* (A) und *Myh7* (B) zeigte in der mit dem Peptid-Antagonisten behandelten Gruppe (PE + Peptid) im Vergleich zu den PE erhöhte Werte für *Myh6* sowie verringerte Werte für *Myh7*. Auch für *Myh6* konnten erniedrigte Werte in der gesunden Kontrollgruppe im Unterschied zu PE festgestellt werden. Alle Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. SEM = Standardfehler, WT Vehikel = Wildtyp-Kontrollgruppe (n = 8), PE Vehikel = Präeklampsiegruppe (n = 8), PE + Peptid = mit dem Peptid-Antagonisten behandelte Präeklampsiegruppe (n = 6), a.u. = arbitrary units (willkürliche Einheiten), Der Kruskal-Wallis-Test wurde zur Berechnung der p-Werte von *Myh7* verwendet. Mit Hilfe des One-way ANOVA wurden die p-Werte von *Myh6* berechnet. \*p < 0,05, \*\*\*p < 0,001.

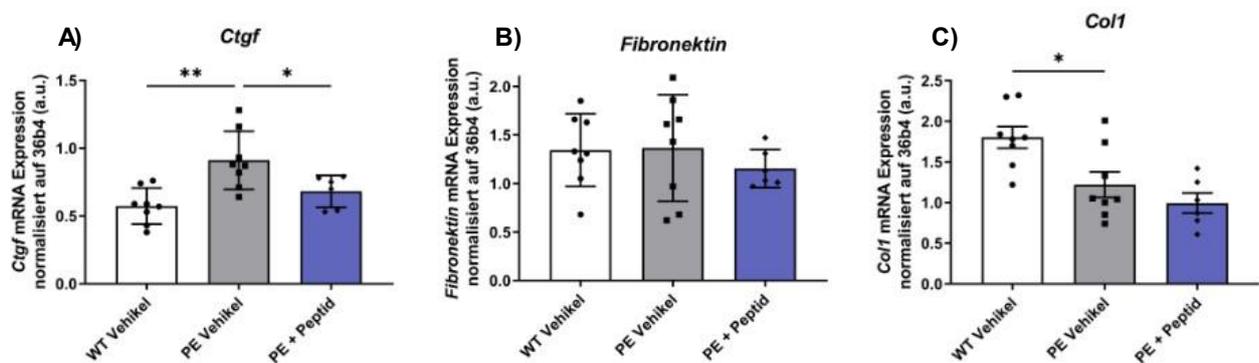


Zu den Fibrosemarkern gehören *Col1*, *Fn* sowie *Ctgf*, (connective tissue growth factor, Bindegewebs-Wachstumsfaktor). Der Bindegewebswachstumsfaktor (CTGF) wird von einer Vielzahl von Zellen produziert, darunter Fibroblasten, Endothelzellen, Chondrozyten und glatte Muskelzelle [103]. Es übt einen chemotaktischen und mitogenen Einfluss auf Fibroblasten aus und gilt als Schlüsselmediator der Produktion von extrazellulärer Matrix unter pathologischen fibrotischen Bedingungen [104]. Wir konnten zeigen, dass die Genexpression von *Ctgf* bei PE im Vergleich zu WT signifikant erhöht war (Abb. 19 A; WT  $0,57 \pm 0,05$  vs. PE  $0,91 \pm 0,08$ , p = 0,001). Nach Behandlung mit Peptid-Antagonisten konnte wiederum eine Normalisierung der *Ctgf* Werte bei PE + Peptid beobachtet werden (Abb. 19 A; PE  $0,91 \pm 0,08$  vs. PE + Peptid  $0,68 \pm 0,05$ , p = 0,03). Für *Fn* konnten ähnlich wie in der Histologie keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und PE bzw. PE und PE + Peptid nachgewiesen werden (Abb. 19 B: WT  $1,34 \pm 0,13$  vs. PE  $1,37 \pm 0,19$ , p = 0,99, PE  $1,37 \pm 0,19$  vs. PE + Peptid  $1,15 \pm 0,08$ , p = 0,55). *Col1* zeigte signifikant erniedrigte Werte bei PE im Vergleich zu WT (Abb. 19 C: WT  $1,8 \pm 0,13$  vs. PE  $1,22 \pm 0,16$ , p = 0,01). Es konnten

keine signifikanten Unter-schiede zwischen PE und PE + Peptid festgestellt werden (Abb. 19 C: PE  $1,22 \pm 0,16$  vs. PE + Peptid  $0,99 \pm 0,12$ ,  $p = 0,46$ ).

### Abb. 19 – Genexpression von Fibrosemarkern

Die Genexpressionsanalyse der Fibrosemarker zeigte signifikant erhöhte Werte für *Ctgf* in PE im Vergleich zu WT. Nach Behandlung mit dem Peptid-Antagonisten konnte eine Normalisierung der *Ctgf* Werte beobachtet werden (A). Die Genexpression von *Fibronektin* unterschied sich nicht signifikant zwischen WT und PE bzw. PE und PE + Peptid (B). PE-Tiere zeigten weiterhin im Vergleich zu WT-Tieren eine erniedrigte Expression von *Col1* (C). Alle Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. SEM = Standardfehler, WT Vehikel = Wildtyp-Kontrollgruppe ( $n = 8$ ), PE Vehikel = Präeklampsiegruppe ( $n = 8$ ), PE + Peptid = mit dem Peptid-Antagonisten behandelte Präeklampsiegruppe ( $n = 6$ ), a.u. = arbitrary units (willkürliche Einheiten), One-way ANOVA: \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ .

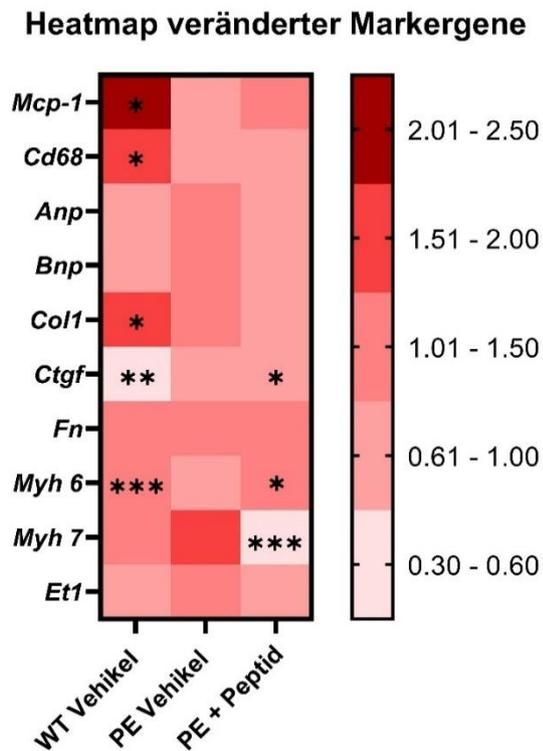


Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse der verschiedenen Markergene wurden in Form eines Heatmap visualisiert (Abb. 20). Die einzelnen Zeilen der Matrix stehen für die verschiedenen Gene, die gemessen wurden, während die Spalten die verschiedenen Gruppen (WT-Vehikel, PE-Vehikel, PE + Peptid) darstellen. Die Farbpalette spiegelt wiederum die Variationen in der Genexpression wider. Niedrige Werte wurden durch helle Rottöne dargestellt, während hohe Werte durch dunklere Rottöne abgebildet wurden. Die Farbkodierung basiert auf den Mittelwerten der einzelnen Gruppen, die in der Tabelle 12 als absolute Zahlen angegeben sind.

### Abb. 20 – Heatmap veränderter Markerene

Die Heatmap wurde verwendet, um die Genexpression bestimmter Markergene darzustellen. Die Farbkodierung basiert auf den Mittelwerten der einzelnen Gruppen, die in der Tabelle 12 nochmals aufgeführt wurden. Die Werte wurden zuvor bereits mit dem Housekeeping-Gen 36b4 normalisiert, so dass die Farbe der einzelnen Kästchen relative Werte repräsentiert. Niedrige Werte wurden mittels heller Rottöne veranschaulicht, während hohe Werte durch dunklere Rottöne dargestellt wurden. Die Werte von WT-Tieren bzw. PE + Peptid Tieren wurden jeweils mit PE-Tieren verglichen. Zur

Berechnung der p-Werte von *Cd68*, *Anp* und *Myh7* wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Mit Hilfe des One-way ANOVA wurden die p-Werte von *Mcp-1*, *Bnp*, *Col1*, *Ctgf*, *Fn*, *Myh6* und *Et1* berechnet. WT Vehikel = Wildtyp-Kontrollgruppe (n = 8), PE Vehikel = Präeklampsiegruppe (n = 8), PE + Peptid = mit dem Peptid-Antagonisten behandelte Präeklampsiegruppe (n = 6). \*signifikant im Vergleich zu PE: p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001.



**Tab. 20 – Genexpressionsanalyse der spezifischen Markergene**

Die Tabelle 12 zeigt die Quantifizierung der Genexpression spezifischer Markergene unter Angabe ihrer Mittelwerte in Relation zum housekeeping Gen *36b4*. Alle Werte sind als Mittelwert ± SEM angegeben. SEM = Standardfehler, WT Vehikel = Wildtyp-Kontrollgruppe, PE Vehikel = Präeklampsiegruppe, PE + Peptid = mit dem Peptid-Antagonisten behandelte Präeklampsiegruppe. Zur Berechnung der p-Werte von *Cd68*, *Anp* und *Myh7* wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Mit Hilfe des One-way ANOVA wurden die p-Werte von *Mcp-1*, *Bnp*, *Col1*, *Ctgf*, *Fn*, *Myh6* und *Et1* berechnet. °WT vs. PE oder PE + Peptid: signifikant (p < 0,05), \*WT vs. PE: signifikant (p < 0,05), † PE vs. PE + Peptid: signifikant (p < 0,05).

Gen	WT	PE	PE + Peptid
<i>36b4</i>	22,1 ± 0,094	20,96 ± 0,08°	21,16 ± 0,11°
<i>Mcp-1</i>	2,27 ± 0,45*	0,91 ± 0,17	1,41 ± 0,34
<i>Cd68</i>	1,69 ± 0,4*	0,92 ± 0,11	0,81 ± 0,06
<i>Anp</i>	0,73 ± 0,18	1,15 ± 0,20	0,99 ± 0,27

<i>Bnp</i>	0,86 ± 0,11	1,12 ± 0,20	0,84 ± 0,09
<i>Col1</i>	1,8 ± 0,13*	1,22 ± 0,16	0,99 ± 0,12
<i>Ctgf</i>	0,57 ± 0,05*	0,91 ± 0,08	0,68 ± 0,05*
<i>Fn</i>	1,34 ± 0,13	1,37 ± 0,19	1,15 ± 0,08
<i>Myh6</i>	1,37 ± 0,06*	0,86 ± 0,08	1,21 ± 0,12*
<i>Myh7</i>	1,44 ± 0,082	1,51 ± 0,21	0,56 ± 0,10*
<i>Et1</i>	0,96 ± 0,11	1,17 ± 0,16	0,96 ± 0,13

## 6. Diskussion

Hauptaussage:

An Tag 21 der Schwangerschaft zeigten PE + Peptid Tiere im Vergleich zu PE-Tieren eine Verbesserung der Herzfunktion, welche sich echokardiographisch durch erhöhte negative Werte für die GLS zeigte. Immunhistologisch konnte weiterhin eine Verringerung der Entzündungs- und Fibrosemarker im Myokard sowie eine reduzierte LV-Hypertrophie nachgewiesen werden. Charakteristische krankheitsbedingte Unterschiede, wie funktionelle Veränderungen sowie das strukturelle Remodelling des Herzens zwischen PE-Tieren und WT-Tieren konnten von unserer Arbeitsgruppe bereits im gleichen Tiermodell sowohl am Ende der Schwangerschaft als auch in Langzeituntersuchungen nachgewiesen werden [90]. Aus diesem Grund nimmt die folgende Diskussion gezielteren Fokus auf den Effekt des Peptid-Antagonisten bei PE-Tieren (PE + Peptid) im Vergleich zu PE-Tieren, die mit dem Vehikel behandelt wurden.

### 6.1. Therapeutische Effekte des Peptid-Antagonisten auf das Herz

Als echokardiographisches Korrelat der Herzfunktion konnte zwar keine signifikante Verbesserung der EF nachgewiesen werden, es zeigten sich jedoch höher negative Werte für den GLS in der PE + Peptid Gruppe im Vergleich zu PE-Tieren. Regional wurde die deutlichste Verbesserung im basoseptalen Segment beobachtet. Dies

deutet auf eine verbesserte Pumpleistung hin und bestätigt die höhere Sensitivität des GLS im Vergleich zur EF, welche in vorherigen Studien bereits nachgewiesen wurde [105]. Die Ursache dafür, dass die GLS beim Nachweis einer myokardialen Dysfunktion sensitiver zu sein scheint, könnte zum Teil auf die eingeschränkte Fähigkeit der EF zurückzuführen sein, die systolische Funktion bei Hypertrophie zu beurteilen [106]. Dies liegt daran, dass hypertrophe Ventrikel bei der Kontraktion aufgrund einer stärkeren Verdickung der Ventrikelwände eine größere Verringerung des Hohlraumvolumens aufweisen als Ventrikel mit normaler Wanddicke [106]. Dies ist insofern relevant für die Diagnostik von Patienten mit PE, da bei diesen eine Hypertrophie nachweisbar ist [107]. Gleichzeitig konnte bei Patienten mit PE beobachtet werden, dass diese zwar eine tendenziell erniedrigte, jedoch zum Teil eine erhaltene Pumpfunktion aufweisen [108], während sich in der GLS jedoch bereits eine myokardiale Dysfunktion abzeichnet [109]. Ein weiterer Grund für die erhöhte Sensitivität der GLS liegt in der Tatsache, dass sich die longitudinalen Myokardfasern vorwiegend im Subendokard befinden, also in der Wandschicht, die am anfälligsten für eine Ischämie ist [106]. Herzspezifische Troponine sind dabei wichtige zirkulierende Biomarker bei Verdacht auf eine Myokardischämie. In einigen Studien (nicht allen) konnte gezeigt werden, dass das Troponin I bei Frauen mit Präeklampsie erhöht ist [110]. Tatsächlich steigt bei Frauen mit Präeklampsie nicht nur das Risiko für das Auftreten eines Myokardinfarkts an [110], sondern auch für die Entwicklung einer ischämischen Herzkrankheit [56]. Das Vorhandensein neuer regionaler Wandbewegungsanomalien wurde bereits von der ESC als diagnostisches Kriterium für die Diagnose eines Myokardinfarkts aufgenommen und als solches mit ischämischen EKG-Veränderungen gleichgesetzt [111]. Der Nachweis von Störungen der regionalen Wandbewegung könnte daher in Zukunft helfen, auch die Diagnose einer PE zu unterstützen und so eine frühere Erkennung von Herzfunktionsstörungen bei Patienten mit PE zu ermöglichen [112].

Nach Behandlung mit dem Peptid-Antagonisten konnten weiterhin erhöhte Werte für den linksventrikulären enddiastolischen Durchmesser (LVEDD) und das enddiastolische Volumen (EDV) nachgewiesen werden, wobei sich erst im t-Test signifikant erhöhte Werte ( $p < 0,05$ ) für das EDV ergaben. Die Differenz aus EDV und endsystolischem Volumen (ESV) bildet das Schlagvolumen (SV). In unseren Versuchen konnten wir sowohl eine Erhöhung der SV als auch der EDV nachweisen.

Das ESV blieb dagegen unverändert. Ursache für das erhöhte SV nach Behandlung könnte daher entweder eine erhöhte Vorlast oder eine verbesserte Relaxation sein. In diesem Zusammenhang ist bereits bekannt, dass ACE-Hemmer nachweislich sowohl die Vor- als auch die Nachlast durch arterielle und venöse Dilatation verringern, wobei dies insbesondere bei Vorliegen einer linksventrikulären Dysfunktion von Vorteil ist [113]. Auch Frauen mit PE zeigten in Studien Anzeichen einer diastolischen Dysfunktion [114], welche postpartum bestehen bleibt [93] und mit einem vierfach erhöhten Risiko für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz verbunden ist [63]. In den Gewebedopplerparametern wiesen wir zudem bei PE + Peptid Tieren eine Erhöhung der frühdiastolischen, aktiven Mitralanulusgeschwindigkeit nach. Erniedrigte Werte wären zwar nicht beweisend, jedoch hinweisend für eine Relaxationsstörung, sodass die Behandlung mit dem Peptid-Antagonisten gegen den AT1-R wohlmöglich über beide Mechanismen (erhöhte Vorlast, verbesserte Relaxation) zu einem erhöhtem SV führte.

Ähnliche Ergebnisse wurden in der randomisierten kontrollierten Studie von Ormesher et al. [115] beobachtet, welche eine sechsmonatige Behandlung mit dem ACE-Hemmer Enalapril bei Frauen mit PE zur Verbesserung der postnatalen Herz-Kreislauf-Funktion untersuchte. In dieser Studie führte die Behandlung mit dem ACE-Hemmer im Vergleich zu Placebo zu einer Verbesserung der diastolischen Funktion, welche anhand des E/E'-Quotienten (Verhältnis der frühen mitralen Einströmgeschwindigkeit zur frühen diastolischen Mitralanulusgeschwindigkeit) bestimmt wurde. In welchem Ausmaß diese frühen Verbesserungen jedoch auch zur Verringerung des langfristigen Risikos kardiovaskulärer Erkrankungen beitragen könnten [115], müsste anhand von Langzeitdaten überprüft werden.

Mit dem Peptidantagonisten behandelte Tiere wiesen weiterhin immunhistologisch am Tag 21 der Schwangerschaft im Vergleich zu PE-Tieren eine signifikant reduzierte LV-Hypertrophie auf. Die Erhöhung der LV-Masse in PE-Tieren kann dabei nicht nur als adaptive Reaktion zur Verringerung der mit einer erhöhten Nachlast verbundenen Wandspannung verstanden werden [114], sondern dient auch der Wiederherstellung der Herzmuskelfunktion [116]. Präeklampsische Frauen zeigen im Gegensatz zur physiologisch während der Schwangerschaft auftretenden exzentrischen Hypertrophie eine konzentrische Hypertrophie des Herzens [60, 61], welche durch eine verminderte myokardiale Kontraktilität gekennzeichnet ist [62]. Myosin ist das molekulare

Motorprotein und interagiert als hexamerer Proteinkomplex mit Aktin, um die Energie der ATP-Hydrolyse in mechanische Arbeit umzuwandeln [117]. Es setzt sich zusammen aus zwei schweren und vier leichten Ketten [118]. Im menschlichen Herzen unterscheidet man zwei Untereinheiten der schweren Kette (MHC, myosin heavy chain). Die  $\beta$ -Untereinheit (Gen: *Myh7*) wird überwiegend in den Ventrikel, wohingegen die  $\alpha$ -Isoform (Gen: *Myh6*) primär in den Vorhöfen gebildet wird [119]. Infolge einer pathologischen Hypertrophie wird insbesondere  $\beta$ -MHC vermehrt gebildet [117]. Passend dazu zeigten die mit dem Peptid-Antagonisten behandelten Tiere in unseren Experimenten zusätzlich zu einer reduzierten LV-Hypertrophie auch eine signifikant verringerte Genexpression von *Myh7*.

Trotz der geringen Gesamtmenge des  $\alpha$ -MHC im Herzen, hat diese Isoform einen unverhältnismäßig großen Einfluss auf die kontraktile Kraftproduktion der Herzmuskelzellen [118]. Grund hierfür ist u.a. die höhere ATPase Aktivität des  $\alpha$ -MHC, welche mit der Verkürzungsgeschwindigkeit der Kardiomyozyten korreliert. Daher steht eine verringerte Expression von  $\alpha$ -MHC in einem engen Zusammenhang mit einer Herzinsuffizienz [117, 120] und ist auch während einer präeklampsischen Schwangerschaft reduziert [90]. Tatsächlich konnte auch in unseren Versuchen gezeigt werden, dass sich die Genexpression von *Myh6* bei Behandlung mit dem Peptid-Antagonisten signifikant anstieg.

PE + Peptid Tiere wiesen in der Immunhistochemie einen verringerten Anteil von Makrophagen im Myokard auf, welche an der pathologischen Umstrukturierung des linken Ventrikels beteiligt sind [90]. Weiterhin zeigten PE + Peptid Tiere eine verminderte perivaskuläre Fibrose und mediale Wandverdickung. Sowohl das konzentrische Remodelling des Herzens als auch die Effektorhormone des RAS (Renin, ANG II, Aldosteron) stehen dabei in einem engen Zusammenhang mit der perivaskulären und interstitiellen Fibrose des Herzens [64]. Umgekehrt werden fibrosebedingten Strukturveränderungen nachweislich durch verschiedene RAS-Inhibitoren günstig beeinflusst und spielen unter anderem eine wesentliche Rolle bei der Rückbildung der LV-Hypertrophie und Verbesserung der koronaren Flussreserve [121]. CTGF gilt dabei als Schlüsselmediator in der Produktion der extrazellulären Matrix unter pathologischen fibrotischen Bedingungen. Er wird sowohl in Kardiomyozyten bei pro-hypertrophen Stimuli als auch in Fibroblasten rasch hochreguliert [122]. Eine Hochregulierung der *Ctgf*-Expression konnte zudem unter

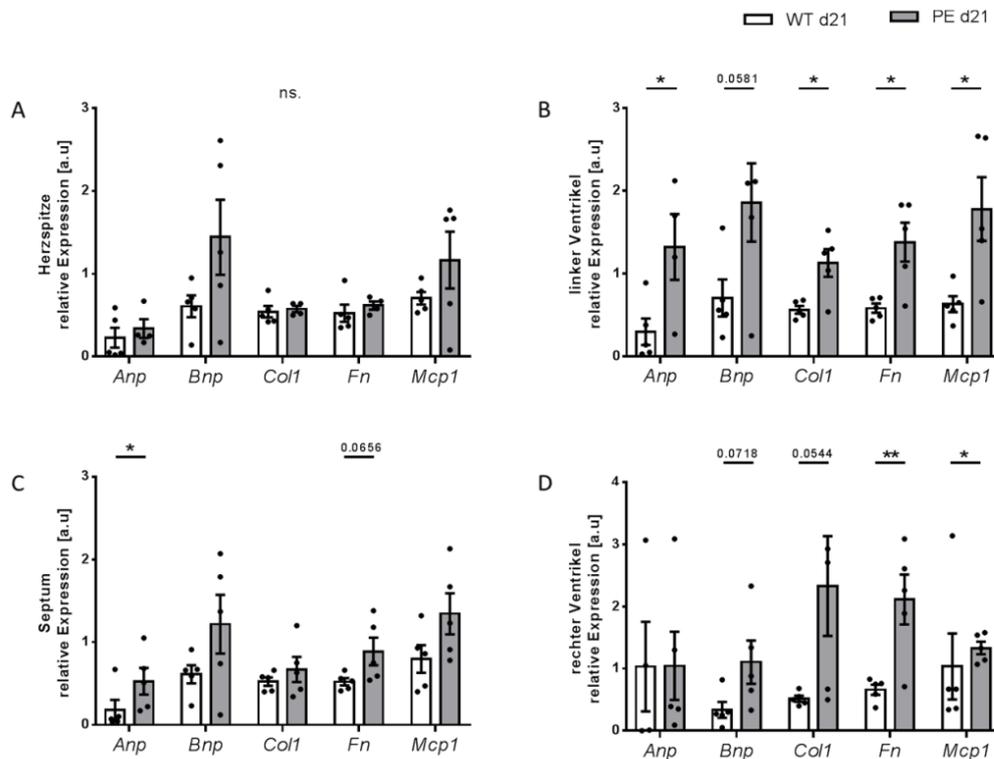
Ang II Infusion beobachtet werden [104]. Die erhöhte Expression im erwachsenen Herzen konnte wiederum in verschiedenen Modellen von Fibrose, Herzinsuffizienz und Herzhypertrophie nachgewiesen werden [104]. Passend dazu beobachteten wir in unseren Experimenten, dass die Behandlung mit dem Peptidantagonisten neben einer Verringerung der LV-Hypertrophie und perivaskulären Fibrose auch zu einer Herunterregulierung der *Ctgf*-Genexpression führte.

Für die Marker *Anp*, *Bnp*, *Fn* und *Et1* konnten wir keine signifikante Änderung der Genexpression zwischen PE + Peptid bzw. WT und PE-Tieren feststellen. Diese Ergebnisse stimmen dabei für die Marker *Anp*, *Bnp* und *Fn* nicht vollständig mit den histologischen Resultaten überein. Denn zum einen zeigten PE-Tiere im Vergleich zu WT-Tieren eine erhöhte interstitielle Fibrose und zum anderen wiesen mit dem Peptid-Antagonisten behandelte PE-Tiere eine verringerte Linksherzhypertrophie auf. Ähnlich wie unsere Ergebnisse konnten in vorherigen Versuchen von Kräker et al. [90] beobachtet werden, dass die PE zu einem persistierenden strukturellen Remodelling sowie funktionellen Veränderungen im mütterlichen Herzen führt. Zudem wurde nachgewiesen, dass typische Gene für kardiale Hypertrophie, Fibrose oder proinflammatorische Marker keine Veränderungen der Genexpression am Ende der präeklampsischen Schwangerschaft im Bereich des Apex aufweisen (Abb. 21), welche auch in unseren Versuchen untersucht wurde. Ein Vergleich der verschiedenen Regionen im Herzen (Apex, Septum, rechter und linker Ventrikel) konnte letztendlich eine regionenspezifische Genexpression verschiedener Marker aufdecken und nachweisen, dass die meisten Veränderungen der Genexpression von Markergenen im linken Ventrikel stattfinden (Abb. 21) [90]. Insbesondere zeigten sich im linken Ventrikel auch erhöhte Werte für *Anp*, *Bnp* und *Fn* zwischen WT und PE-Tieren. Dies steht im Einklang mit den histologischen Daten, zumal die immunhistologischen Färbungen in unseren Versuchen ebenfalls am linken Ventrikel durchgeführt wurden.

#### **Abb. 21 – Regionenspezifische Genexpression des Herzens**

Um einen Vergleich zu ermöglichen, werden verschiedene spezifische Markergene in unterschiedlichen Regionen des Herzens von WT und PE-Tieren gemessen und analysiert. In der Herzspitze (A) zeigt sich übereinstimmend mit unseren jetzigen Versuchen keine signifikanten Veränderungen der Genexpression für *Anp*, *Bnp*, und *Fn* zwischen WT und PE-Tieren. In den gleichen Herzen zeigt jedoch die Genexpressionsanalyse des linken Ventrikels (B) signifikante Unterschiede für alle 5 genannten Marker. Im Herzseptum (C) findet sich dagegen nur eine erhöhte Expression für *Anp*. Im rechten

Ventrikel (D) konnte ebenfalls für Fn und Mcp1 eine erhöhte Genexpression bei präeklampsischen Tieren im Vergleich zu gesunden Kontrollen nachgewiesen werden. Anp = atriales natriuretisches Peptid, Bnp = natriuretisches Peptid des Gehirns, Col1 = Kollagen Typ 1, Fn = Fibronektin, Mcp1 = Monozyten-Chemoattractant-Protein-1; WT = Wildtyp-Kontrollgruppe, PE = Präeklampsiegruppe, d21 = letzter Tag der Schwangerschaft; Students t-test ns = nicht signifikant, \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$ . Abbildung aus Kräker 2019 [90].



## 6.2. RAS-Inhibitoren und Peptid-Antagonisten als potenzieller Therapieansatz

Ursache der PE ist multifaktoriell, wobei pathophysiologisch eine Dysregulation des lokalen und zirkulierenden RAS nachgewiesen wurde [5-7]. Die wichtigsten pathologischen Folgen der RAS-Aktivierung werden dabei durch den AT1-R vermittelt [123]. Neben seinem blutdrucksteigernden Effekt können AT1-Rezeptoren zu weiteren maladaptiven Reaktionen in Kardiomyozyten führen [123]. Dazu gehört z. B. die Induktion einer zellulären Hypertrophie sowie die Aktivierung von Signalwegen, die mit Fibrose und Entzündung in Verbindung stehen. Aufgrund der wesentlichen Beteiligung einer erhöhten vaskulären und adrenalen Angiotensin-II-Reaktivität an der Pathophysiologie der PE [1], scheinen RAS-Inhibitoren daher vielversprechende therapeutische Medikamente zu sein.

Tatsächlich wurde bereits für ACE-Hemmer nicht nur eine Senkung des mittleren, systolischen sowie diastolischen Blutdrucks bei nicht schwangeren Hypertonikern

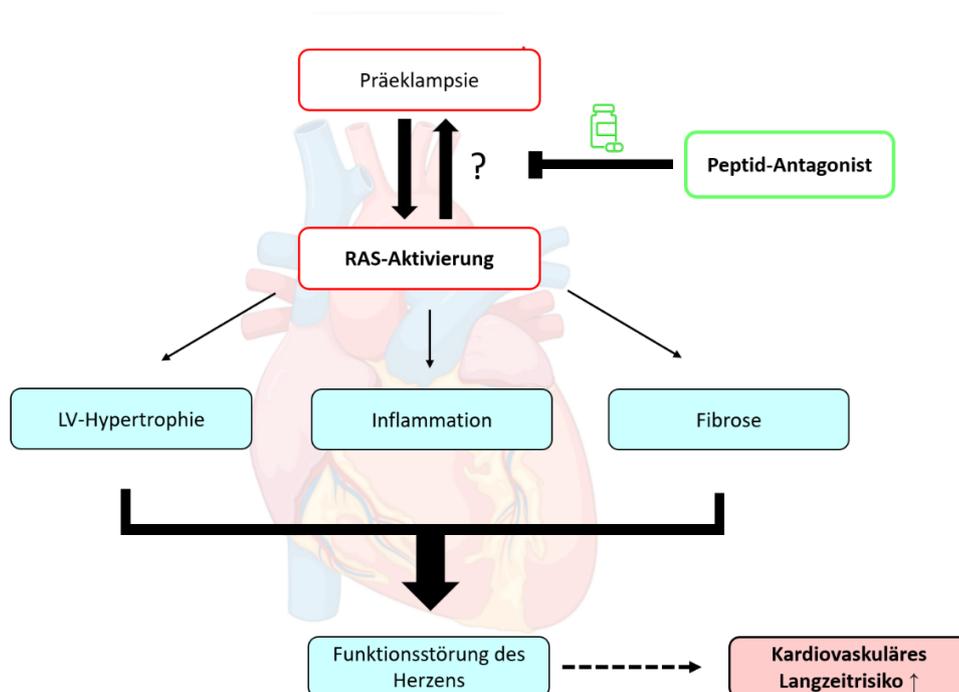
[124] beobachtet, sondern auch über verschiedene Mechanismen eine Kardioprotektion nachgewiesen. Zu diesen Mechanismen gehören neben einer verminderten Fibrose [125] auch eine verringerte Makrophageninfiltration des Herzens [126]. Weiterhin können diverse RAS-Inhibitoren zu einer Rückbildung der LV-Hypertrophie und einer Verbesserung der koronaren Reserve führen [121]. Bei Patienten mit hypertensiver Herzerkrankung konnte zudem gezeigt werden, dass die Hemmung des Enzyms ACE die Myokardfibrose unabhängig von einer LV-Hypertrophie zurückbildet und damit eine Verbesserung der diastolischen LV-Funktion bewirken kann [125]. ACE-Hemmer besitzen zwar eine kardioprotektive Funktion, sind jedoch während der Schwangerschaft aufgrund ihrer fetotoxischen oder teratogenen Wirkung kontraindiziert, da sie langfristig eine fetale Hypotonie, renale tubuläre Dysplasie, Anurie, Oligohydramnion, Wachstumsretardierung bis hin zum Tod des Fetus verursachen können [10]. Das Mittel der Wahl zur Senkung des Blutdrucks bei PE ist daher in Deutschland  $\alpha$ -Methyldopa [13], wobei für keine der gängigen Antihypertensiva sicher nachgewiesen werden konnte, dass sie das langfristige kardiovaskuläre Risiko nach PE verbessern [90], weshalb dringend nach neuen therapeutischen Targets, insbesondere RAS-Inhibitoren, gesucht wird, welche die Plazentaschranke nicht überwinden und den Fetus nicht gefährden.

Wir konnten in unseren Experimenten zeigen, dass die Behandlung mit dem Peptid-Antagonisten gegen den AT1-R in PE-Tieren ähnlich den ACE-Hemmern zu einer Reduktion des MAP, SBP und DBP führte, ohne die Herzfrequenz signifikant zu verändern [124]. Einer der zentralen Vorteile der AT1-R-Blockade besteht darin, dass durch die Hemmung des RAS sehr früh in verschiedenste pathophysiologische Mechanismen eingegriffen wird und somit zahlreiche Pathologien des Herzens (Fibrose, LV-Hypertrophie, Inflammation) zeitgleich positiv beeinflussen werden (Abb. 21). Dies ist insbesondere angesichts der vielschichtigen Pathophysiologie der PE wünschenswert, um so der Komplexität des Krankheitsbildes gerecht zu werden.

Der Peptid-Antagonist von Ferring ist weiterhin so aufgebaut, dass dieser die Plazentaschranke nicht überwinden kann und stellt somit den ersten maternal spezifischen RAS-Inhibitor dar. Dies ist besonders relevant, da sich die Indikation für eine antihypertensive Therapie derzeit auf mütterliche Faktoren konzentriert und gegenwärtige Antihypertensiva keinen sicheren Nutzen für das fetale Outcome gezeigt haben [70, 72].

## Abb. 22 – funktionelle und strukturelle Veränderungen des Herzens bei PE

Wesentliches Merkmal der PE ist eine übermäßige Aktivierung des RAS aufgrund einer vaskulären und adrenalen Sensibilität gegenüber Ang II. Unklar bleibt jedoch, ob die Dysregulation des RAS ein primär aktiver Mechanismus in der Pathogenese der Erkrankung ist oder ob es sich um eine organische Reaktion auf eine bereits bestehende Erkrankung handelt [48]. Die Aktivierung des RAS führt wiederum zu zahlreichen funktionellen und strukturellen Veränderungen am Herzen. Dazu gehören insbesondere eine Fibrose (perivaskulär und interstitiell), LV-Hypertrophie und eine Inflammation, welche gemeinsam zu einer kardialen Dysfunktion beitragen und somit das kardiovaskuläre Langzeit-Risiko erhöhen. Die Blockade des AT1-R durch den Peptidantagonisten kann ihrerseits an der Quelle der pathophysiologischen Mechanismen ansetzen, indem sie eine übermäßige Aktivierung des RAS verhindert und so die oben genannten pathophysiologischen Prozesse positiv beeinflusst. Folge ist ein Rückgang der Fibrose, Hypertrophie und Inflammation sowie eine Verbesserung der Funktionsstörung des Herzens (blau).



## 7. Perspektive und Limitationen

Ziel der Behandlung mit dem Peptidantagonisten ist nicht nur eine solide Senkung des Blutdrucks, sondern auch die Verbesserung der mütterlichen Endorganschäden der PE, ohne dabei jedoch die fetale Gesundheit zu beeinträchtigen. Zukünftige Studien müssen allerdings den Effekt der RAS-Blockade auf den Fetus und das fetoplazentare

Gefäßsystem beleuchten, insbesondere im Hinblick auf die Entwicklung einer intrauterinen Wachstumsretardierung, die sowohl als Komplikation der PE auftreten kann [16, 17] als auch als Nebenwirkung bei Behandlung mit RAS-Inhibitoren beschrieben wurde [10]. Als weitere wesentliche Komplikation müsste zudem eine Hypotonie der Mutter und des Fetus beachtet werden, welche sich aus dem physiologischen Wirkmechanismus des Therapeutikums ergibt. So wurde für ACE-Hemmern gezeigt, dass bei Risikopatienten schon eine einmalige Gabe innerhalb von wenigen Stunden zu einem Blutdruckabfall führen kann, wobei ein Blutdruckabfall wiederum das Risiko einer Nieren-, Myokard- oder zerebralen Hypoperfusion erhöht [127]. Bekannte Risikofaktoren für diese sogenannte first-dose-Hypotonie ist z.B. eine Herzinsuffizienz [128] oder ein akuter Herzinfarkt [129]. Da bei der PE neben funktionellen und strukturellen Veränderungen des Herzens [90] auch ein erhöhtes Risiko für das Auftreten eines Myokardinfarkts [110] nachgewiesen wurde, muss die Hypotonie als wesentliche Komplikation bei der Gabe des Peptid-Antagonisten gegen den AT1-R stets berücksichtigt werden.

Weiterhin ist zu beachten, dass das angewandte transgene Rattenmodell eine Monokausalität in Bezug auf die Dysregulation des RAS vermuten lässt, insbesondere da wir uns auf die Blockade des AT1-R in einem transgenen Rattenmodell konzentriert haben, welches auf eine erhöhte Produktion von zirkulierendem Ang II beruht [91]. Die PE stellt jedoch eine komplexe Erkrankung mit multiplen Ursachen und Mechanismen dar, weshalb der Effekt einer Behandlung mit dem Peptid-Antagonist auch in anderen Tiermodellen der PE wie z.B. dem RUPP-Modell [130] oder dem transgenen sFlt1-Mausmodell [131] geprüft werden sollte. Das RUPP-Modell beruht dabei auf die Annahme, dass eine Verringerung des uterinen Blutflusses zur Entwicklung der typischen Komponenten einer PE (z.B. Bluthochdruck und Proteinurie) führt [130]. Im Gegensatz dazu stützt sich das transgene sFlt1-Mausmodell auf die Erkenntnis, dass erhöhte Konzentrationen des anti-angiogenen Faktors sFlt1 den Umbau der Spiralarterien beeinträchtigen können und so zur Manifestation von PE-Symptomen bei der Mutter führen [131]. Da tatsächlich auch bei Patienten mit PE eine Erhöhung von sFlt-1 und eine Verringerung der pro-angiogenen Faktoren PlGF und VEGF nachgewiesen wurde, besteht eine wesentliche Einschränkung dieser Dissertation darin, dass die pro-angiogenen Faktoren VEGF und PlGF sowie die antiangiogen wirkende sFlt-1 nicht bestimmt wurden. Von besonderem Interesse wäre dabei die

Wirkung der RAS-Blockade auf die durch sFlt-1 vermittelte endotheliale Dysfunktion. Da ein Teil der Pathogenese der PE auch auf eine Plazentainsuffizienz zurückgeführt wird, müssten in künftigen Studien auch die Auswirkungen der RAS-Blockade auf die uteroplazentare Einheit untersucht werden, wobei der Schwerpunkt hierbei unter anderem auf die uterine Perfusion und plazentare Ischämie sowie die fetale Gesundheit liegen sollte. Das im Rahmen dieser Dissertation verwendete Tiermodell sollte daher als Teil eines umfassenderen Forschungsansatzes gewertet werden, welches durch Einbeziehung weiterer Tiermodelle dazu beiträgt, die Evaluation neuer therapeutische Ansätze zu verbessern und unser Verständnis der Pathophysiologie der PE zu vertiefen.

Eine weitere Limitation dieser Doktorarbeit ist, dass die Verabreichung des Therapeutikums in unseren Versuchen täglich subkutan über eine Osmosepumpe erfolgte. Die Vorhersage der subkutanen Absorption von Biotherapeutika beim Menschen aus präklinischen Experimenten ist jedoch weitgehend unbefriedigend, was vor allem auf das begrenzte Verständnis der Mechanismen der subkutanen Absorption und die erheblichen Unterschiede zwischen den Tierarten zurückzuführen ist [132]. Wichtige Spezies-spezifische Unterschiede in der Arzneimittelabsorption ergeben sich dabei unter anderem aus der unterschiedlichen Struktur der Haut und des subkutanen Raums sowie dem Katabolismus an der Injektionsstelle [133]. Bereits bei den präklinischen Sicherheitstests an Tieren scheitern etwa ein Drittel der experimentellen Arzneimittel, da sie sich als unwirksam oder zu gefährlich erweisen [134]. Die schlechte Korrelation von Tierversuchen mit der Toxizität und Wirksamkeit beim Menschen hat daher Forscher dazu veranlasst, den Wert von Tierversuchen für die Auswahl von Arzneimitteln für Versuche am Menschen in Frage zu stellen [134]. Das Herz stellt jedoch eine große Herausforderung für die Reduzierung von Tierversuchen dar, zumal nicht nur die pharmakologische Wirkung von Arzneimitteln auf die Zellen untersucht wird, sondern auch die Auswirkungen der topografischen Eigenschaften, Bewegung und der Kräfte auf die mechanische Funktion des Herzens geprüft werden [134]. Tiermodelle scheinen daher nach wie vor essentiell zur Untersuchung der Wirksamkeit neuer Arzneimittel am Herzen zu sein, insbesondere bei Krankheiten mit multifaktorieller Ätiologie wie der PE. Perspektivisch könnten jedoch Algorithmen des maschinellen Lernens zur für Reduktion von Misserfolgen zukünftiger Wirksamkeitsstudien beitragen. Tatsächlich werden zu diesem Zwecke bereits Vorhersagemodelle

zur Analyse der Bindungsaffinität [135], Wirksamkeit [136] und Toxizität [137] neuer Arzneimittelkandidaten verwendet. Auch in Tierversuchen könnte maschinelles Lernen zur Analyse von histologischen und echokardiographischen Bildern und anderer großer Datenmengen eingesetzt werden, was auch eine Standardisierung der Analysen ermöglichen würde. Für das verwendete Tiermodell muss jedoch die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die humane Situation geprüft werden. In der Studie von Kräker et. al. [90] ließ sich bereits in der Echokardiographie 4 Wochen postpartal die Übertragbarkeit des verwendeten transgenen Rattenmodells auf die humane Situation sichern, sodass für das dieses Tiermodell ein translationaler Ansatz vermutet wird. Da jedoch Schwangere mit PE auch ein erhöhtes kardiovaskuläres Langzeit-Risiko für z.B. Bluthochdruck, Schlaganfall, ischämische Herzerkrankungen und Herzinsuffizienz aufweisen [3], sind dementsprechend auch Langzeit-Daten zum Einfluss der Behandlung mit dem Peptidantagonisten auf postpartale strukturelle und funktionelle Veränderungen notwendig, welche im Rahmen dieser Dissertation nicht erhoben wurden.

Der besondere Beitrag dieser Dissertation liegt in der Fokussierung auf das kardiovaskuläre System der Mutter, dessen Auswirkungen bei PE lange Zeit vernachlässigt wurden, nun aber zunehmend in den Fokus rücken. Da das Peptid die Plazentaschranke nicht passieren und somit den Fötus nicht beeinträchtigen sollte, besteht die Möglichkeit, mit einem peptidbasierten Therapieansatz die Mutter während der Schwangerschaft selektiv zu behandeln. Die Attraktivität von Peptiden besteht dabei darin, dass es sich um körpereigene Bausteine handelt, die sich aufgrund ihrer kürzeren Halbwertszeit kaum in den Geweben anreichern [80]. Die geringe Toxizität beruht u.a. auch auf der hohen Affinität und Spezifität [80, 81, 84] von Peptiden, sowie ihrer geringen Immunogenität [79]. Zusammenfassend stellt unsere präklinische Studie zur Wirksamkeit der Peptid-Antagonisten am transgenen Rattenmodell daher einen kleinen, aber bedeutenden Schritt bei der Erprobung des ersten maternal spezifischen RAS-Inhibitors dar, und zwar vor der Translation der Ergebnisse in klinischen Studien.

## 8. Literaturverzeichnis

1. Quitterer, U., X. Fu, A. Pohl, K.M. Bayoumy, A. Langer, and S. AbdAlla, *Beta-Arrestin1 Prevents Preeclampsia by Downregulation of Mechanosensitive AT1-B2 Receptor Heteromers*. *Cell*, 2019. **176**(1-2): p. 318-333.e19.
2. Redman, C.W. and I.L. Sargent, *Latest advances in understanding preeclampsia*. *Science*, 2005. **308**(5728): p. 1592-4.
3. Sibai, B., G. Dekker, and M. Kupferminc, *Pre-eclampsia*. *Lancet*, 2005. **365**(9461): p. 785-99.
4. Melchiorre, K., R. Sharma, and B. Thilaganathan, *Cardiovascular implications in preeclampsia: an overview*. *Circulation*, 2014. **130**(8): p. 703-14.
5. Herse, F., A.C. Staff, L. Hering, D.N. Müller, F.C. Luft, and R. Dechend, *AT1-receptor autoantibodies and uteroplacental RAS in pregnancy and pre-eclampsia*. *J Mol Med (Berl)*, 2008. **86**(6): p. 697-703.
6. Li, C., R. Ansari, Z. Yu, and D. Shah, *Definitive molecular evidence of renin-angiotensin system in human uterine decidual cells*. *Hypertension*, 2000. **36**(2): p. 159-64.
7. Nielsen, A.H., K.H. Schauser, and K. Poulsen, *Current topic: the uteroplacental renin-angiotensin system*. *Placenta*, 2000. **21**(5-6): p. 468-77.
8. Shah, D.M., *The role of RAS in the pathogenesis of preeclampsia*. *Curr Hypertens Rep*, 2006. **8**(2): p. 144-52.
9. Odigboegwu, O., L.J. Pan, and P. Chatterjee, *Use of Antihypertensive Drugs During Preeclampsia*. *Front Cardiovasc Med*, 2018. **5**: p. 50.
10. Steffensen, F.H., G.L. Nielsen, H.T. Sørensen, C. Olesen, and J. Olsen, *Pregnancy outcome with ACE-inhibitor use in early pregnancy*. *Lancet*, 1998. **351**(9102): p. 596.
11. Redman, C.W. and I.L. Sargent, *Immunology of pre-eclampsia*. *Am J Reprod Immunol*, 2010. **63**(6): p. 534-43.
12. Ives, C.W., R. Sinkey, I. Rajapreyar, A.T.N. Tita, and S. Oparil, *Preeclampsia-Pathophysiology and Clinical Presentations: JACC State-of-the-Art Review*. *J Am Coll Cardiol*, 2020. **76**(14): p. 1690-1702.
13. *Hypertensive Pregnancy Disorders: Diagnosis and Therapy. Guideline of the German Society of Gynecology and Obstetrics (S2k-Level, AWMF-Registry No. 015/18, . March 2019*. Retrieved from: <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/015-018.html>. Last retrieval date: 30-08-2023.
14. Sibai, B.M., *Diagnosis, controversies, and management of the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count*. *Obstet Gynecol*, 2004. **103**(5 Pt 1): p. 981-91.
15. Rana, S., E. Lemoine, J.P. Granger, and S.A. Karumanchi, *Preeclampsia: Pathophysiology, Challenges, and Perspectives*. *Circ Res*, 2019. **124**(7): p. 1094-1112.
16. Villar, J., G. Carroli, D. Wojdyla, E. Abalos, D. Giordano, H. Ba'aqueel, U. Farnot, P. Bergsjø, L. Bakketeig, P. Lumbiganon, L. Campodónico, Y. Al-Mazrou, M. Lindheimer, and M. Kramer, *Preeclampsia, gestational hypertension and intrauterine growth restriction, related or independent conditions?* *Am J Obstet Gynecol*, 2006. **194**(4): p. 921-31.
17. Jaffe, R., *Development of early uteroplacental circulation*. *Early Pregnancy*, 2001. **5**(1): p. 34-5.

18. Ray, J.G., M.J. Vermeulen, M.J. Schull, and D.A. Redelmeier, *Cardiovascular health after maternal placental syndromes (CHAMPS): population-based retrospective cohort study*. *Lancet*, 2005. **366**(9499): p. 1797-803.
19. Redman, C.W. and I.L. Sargent, *The pathogenesis of pre-eclampsia*. *Gynecol Obstet Fertil*, 2001. **29**(7-8): p. 518-22.
20. Morath, C., E. Ritz, and K. Andrassy, *Präeklampsie /Eklampsie*, in *Innere Medizin*, H. Greten, F. Rinninger, and T. Greten, Editors. 2010, Georg Thieme Verlag KG.
21. Granger, J.P., B.T. Alexander, M.T. Llinas, W.A. Bennett, and R.A. Khalil, *Pathophysiology of hypertension during preeclampsia linking placental ischemia with endothelial dysfunction*. *Hypertension*, 2001. **38**(3 Pt 2): p. 718-22.
22. Lecarpentier, E. and V. Tsatsaris, *Angiogenic balance (sFlt-1/PlGF) and preeclampsia*. *Ann Endocrinol (Paris)*, 2016. **77**(2): p. 97-100.
23. Pijnenborg, R., L. Vercruyse, and M. Hanssens, *The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies*. *Placenta*, 2006. **27**(9-10): p. 939-58.
24. Young, B.C., R.J. Levine, and S.A. Karumanchi, *Pathogenesis of preeclampsia*. *Annu Rev Pathol*, 2010. **5**: p. 173-92.
25. Makris, A., C. Thornton, J. Thompson, S. Thomson, R. Martin, R. Ogle, R. Waugh, P. McKenzie, P. Kirwan, and A. Hennessy, *Uteroplacental ischemia results in proteinuric hypertension and elevated sFLT-1*. *Kidney Int*, 2007. **71**(10): p. 977-84.
26. Maynard, S.E., J.Y. Min, J. Merchan, K.H. Lim, J. Li, S. Mondal, T.A. Libermann, J.P. Morgan, F.W. Sellke, I.E. Stillman, F.H. Epstein, V.P. Sukhatme, and S.A. Karumanchi, *Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia*. *J Clin Invest*, 2003. **111**(5): p. 649-58.
27. Rajakumar, A., H.M. Michael, P.A. Rajakumar, E. Shibata, C.A. Hubel, S.A. Karumanchi, R. Thadhani, M. Wolf, G. Harger, and N. Markovic, *Extra-placental expression of vascular endothelial growth factor receptor-1, (Flt-1) and soluble Flt-1 (sFlt-1), by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in normotensive and preeclamptic pregnant women*. *Placenta*, 2005. **26**(7): p. 563-73.
28. Parrish, M.R., S.R. Murphy, S. Rutland, K. Wallace, K. Wenzel, G. Wallukat, S. Keiser, L.F. Ray, R. Dechend, J.N. Martin, J.P. Granger, and B. LaMarca, *The effect of immune factors, tumor necrosis factor-alpha, and agonistic autoantibodies to the angiotensin II type I receptor on soluble fms-like tyrosine-1 and soluble endoglin production in response to hypertension during pregnancy*. *Am J Hypertens*, 2010. **23**(8): p. 911-6.
29. Ferrara, N., *Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress*. *Endocr Rev*, 2004. **25**(4): p. 581-611.
30. Palm, M., S. Basu, A. Larsson, L. Wernroth, H. Åkerud, and O. Axelsson, *A longitudinal study of plasma levels of soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1), placental growth factor (PlGF), sFlt1: PlGF ratio and vascular endothelial growth factor (VEGF-A) in normal pregnancy*. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2011. **90**(11): p. 1244-51.
31. Chau, K., A. Hennessy, and A. Makris, *Placental growth factor and pre-eclampsia*. *J Hum Hypertens*, 2017. **31**(12): p. 782-786.
32. Karumanchi, S.A. and Y. Bdolah, *Hypoxia and sFlt-1 in preeclampsia: the "chicken-and-egg" question*. *Endocrinology*, 2004. **145**(11): p. 4835-7.
33. Banks, R.E., M.A. Forbes, J. Searles, D. Pappin, B. Canas, D. Rahman, S. Kaufmann, C.E. Walters, A. Jackson, P. Eves, G. Linton, J. Keen, J.J. Walker, and P.J. Selby, *Evidence for the existence of a novel pregnancy-associated soluble variant of the vascular endothelial growth factor receptor, Flt-1*. *Mol Hum Reprod*, 1998. **4**(4): p. 377-86.

34. Kendall, R.L. and K.A. Thomas, *Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(22): p. 10705-9.
35. Levine, R.J., S.E. Maynard, C. Qian, K.H. Lim, L.J. England, K.F. Yu, E.F. Schisterman, R. Thadhani, B.P. Sachs, F.H. Epstein, B.M. Sibai, V.P. Sukhatme, and S.A. Karumanchi, *Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia*. N Engl J Med, 2004. **350**(7): p. 672-83.
36. Zeisler, H., E. Llurba, F. Chantraine, M. Vatish, A.C. Staff, M. Sennström, M. Olovsson, S.P. Brennecke, H. Stepan, D. Allegranza, P. Dilba, M. Schoedl, M. Hund, and S. Verlohren, *Predictive Value of the sFlt-1:PlGF Ratio in Women with Suspected Preeclampsia*. N Engl J Med, 2016. **374**(1): p. 13-22.
37. Saleh, L., K. Verdonk, W. Visser, A.H. van den Meiracker, and A.H. Danser, *The emerging role of endothelin-1 in the pathogenesis of pre-eclampsia*. Ther Adv Cardiovasc Dis, 2016. **10**(5): p. 282-93.
38. Levine, R.J., C. Lam, C. Qian, K.F. Yu, S.E. Maynard, B.P. Sachs, B.M. Sibai, F.H. Epstein, R. Romero, R. Thadhani, and S.A. Karumanchi, *Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia*. N Engl J Med, 2006. **355**(10): p. 992-1005.
39. Ahmed, A., *New insights into the etiology of preeclampsia: identification of key elusive factors for the vascular complications*. Thromb Res, 2011. **127** Suppl 3: p. S72-5.
40. Takimoto-Ohnishi, E., T. Saito, J. Ishida, J. Ohnishi, F. Sugiyama, K. Yagami, and A. Fukamizu, *Differential roles of renin and angiotensinogen in the fetomaternal interface in the development of complications of pregnancy*. Mol Endocrinol, 2005. **19**(5): p. 1361-72.
41. Silbernagl, S., A. Despopoulos jr, and A. Draguhn, *Niere*, in *Taschenatlas Physiologie*, S. Silbernagl, A. Despopoulos jr, and A. Draguhn, Editors. 2018, Georg Thieme Verlag KG.
42. Thomas, W.G. and F.A. Mendelsohn, *Angiotensin receptors: form and function and distribution*. Int J Biochem Cell Biol, 2003. **35**(6): p. 774-9.
43. Irani, R.A. and Y. Xia, *Renin angiotensin signaling in normal pregnancy and preeclampsia*. Semin Nephrol, 2011. **31**(1): p. 47-58.
44. Cooper, A.C., G. Robinson, G.P. Vinson, W.T. Cheung, and F. Broughton Pipkin, *The localization and expression of the renin-angiotensin system in the human placenta throughout pregnancy*. Placenta, 1999. **20**(5-6): p. 467-74.
45. Anton, L. and K.B. Brosnihan, *Systemic and uteroplacental renin-angiotensin system in normal and pre-eclamptic pregnancies*. Ther Adv Cardiovasc Dis, 2008. **2**(5): p. 349-62.
46. Merrill, D.C., M. Karoly, K. Chen, C.M. Ferrario, and K.B. Brosnihan, *Angiotensin-(1-7) in normal and preeclamptic pregnancy*. Endocrine, 2002. **18**(3): p. 239-45.
47. Yart, L., E. Roset Bahmanyar, M. Cohen, and B. Martinez de Tejada, *Role of the Uteroplacental Renin-Angiotensin System in Placental Development and Function, and Its Implication in the Preeclampsia Pathogenesis*. Biomedicines, 2021. **9**(10): p. 1332.
48. Leal, C.R.V., L.B. Costa, G.C. Ferreira, A.d.M. Ferreira, F.M. Reis, and A.C. Simões e Silva, *Renin-angiotensin system in normal pregnancy and in preeclampsia: A comprehensive review*. Pregnancy Hypertension, 2022. **28**: p. 15-20.

49. Gant, N.F., G.L. Daley, S. Chand, P.J. Whalley, and P.C. MacDonald, *A study of angiotensin II pressor response throughout primigravid pregnancy*. *J Clin Invest*, 1973. **52**(11): p. 2682-9.
50. Hering, L., *Die Bedeutung des Renin-Angiotensin-Systems im Tiermodell für Präeklampsie*. Thesis. 2011. *Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin*. Retrieved from: <https://edoc.hu-berlin.de/handle/18452/17202>. Last retrieval date: 30-08-2023.
51. Rieber-Mohn, A.B., M. Sugulle, G. Wallukat, P. Alnæs-Katjavivi, G. Leite Størvold, N. Bolstad, C.W. Redman, R. Dechend, and A.C. Staff, *Auto-antibodies against the angiotensin II type I receptor in women with uteroplacental acute atherosclerosis and preeclampsia at delivery and several years postpartum*. *J Reprod Immunol*, 2018. **128**: p. 23-29.
52. Brewer, J., R. Liu, Y. Lu, J. Scott, K. Wallace, G. Wallukat, J. Moseley, F. Herse, R. Dechend, J.N. Martin, Jr., and B. Lamarca, *Endothelin-1, oxidative stress, and endogenous angiotensin II: mechanisms of angiotensin II type I receptor autoantibody-enhanced renal and blood pressure response during pregnancy*. *Hypertension*, 2013. **62**(5): p. 886-92.
53. Wallukat, G., V. Homuth, T. Fischer, C. Lindschau, B. Horstkamp, A. Jüpner, E. Baur, E. Nissen, K. Vetter, D. Neichel, J.W. Dudenhausen, H. Haller, and F.C. Luft, *Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor*. *J Clin Invest*, 1999. **103**(7): p. 945-52.
54. Wenzel, K., A. Rajakumar, H. Haase, N. Geusens, N. Hubner, H. Schulz, J. Brewer, L. Roberts, C.A. Hubel, F. Herse, L. Hering, F. Qadri, C. Lindschau, G. Wallukat, R. Pijnenborg, H. Heidecke, G. Riemekasten, F.C. Luft, D.N. Muller, B. Lamarca, and R. Dechend, *Angiotensin II type 1 receptor antibodies and increased angiotensin II sensitivity in pregnant rats*. *Hypertension*, 2011. **58**(1): p. 77-84.
55. Innes, K.E., J.H. Wimsatt, and R. McDuffie, *Relative glucose tolerance and subsequent development of hypertension in pregnancy*. *Obstet Gynecol*, 2001. **97**(6): p. 905-10.
56. Williams, D., *Long-term complications of preeclampsia*. *Semin Nephrol*, 2011. **31**(1): p. 111-22.
57. Kalafat, E. and B. Thilaganathan, *Cardiovascular origins of preeclampsia*. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2017. **29**(6): p. 383-389.
58. Kräker, K., J.M. O'Driscoll, T. Schütte, F. Herse, O. Patey, M. Golic, S. Geisberger, S. Verlohren, A. Birukov, A. Heuser, D.N. Müller, B. Thilaganathan, R. Dechend, and N. Haase, *Statins Reverse Postpartum Cardiovascular Dysfunction in a Rat Model of Preeclampsia*. *Hypertension*, 2020. **75**(1): p. 202-210.
59. Lang, R.M., G. Pridjian, T. Feldman, A. Neumann, M. Lindheimer, and K.M. Borow, *Left ventricular mechanics in preeclampsia*. *Am Heart J*, 1991. **121**(6 Pt 1): p. 1768-75.
60. Müller, A.L. and N.S. Dhalla, *Differences in Concentric Cardiac Hypertrophy and Eccentric Hypertrophy*, in *Cardiac Adaptations: Molecular Mechanisms*, B. Ostadal and N.S. Dhalla, Editors. 2013, Springer New York: New York, NY. p. 147-166.
61. Mohseni, Z., M.E.A. Spaanderman, J. Oben, M. Calore, E. Derksen, S. Al-Nasiry, L.J. de Windt, and C. Ghossein-Doha, *Cardiac remodeling and pre-eclampsia: an overview of microRNA expression patterns*. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2018. **52**(3): p. 310-317.
62. Muiesan, M.L., M. Salvetti, C. Monteduro, B. Bonzi, A. Paini, S. Viola, P. Poisa, D. Rizzoni, M. Castellano, and E. Agabiti-Rosei, *Left ventricular concentric geometry during treatment adversely affects cardiovascular prognosis in hypertensive patients*. *Hypertension*, 2004. **43**(4): p. 731-8.

63. Wu, P., R. Haththotuwa, C.S. Kwok, A. Babu, R.A. Kotronias, C. Rushton, A. Zaman, A.A. Fryer, U. Kadam, C.A. Chew-Graham, and M.A. Mamas, *Preeclampsia and Future Cardiovascular Health: A Systematic Review and Meta-Analysis*. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*, 2017. **10**(2).
64. Mohseni, Z., E. Derksen, J. Oben, S. Al-Nasiry, M.E.A. Spaanderman, and C. Ghossein-Doha, *Cardiac dysfunction after preeclampsia; an overview of pro- and anti-fibrotic circulating effector molecules*. *Pregnancy Hypertens*, 2021. **23**: p. 140-154.
65. Janicki, J.S., *Myocardial collagen remodeling and left ventricular diastolic function*. *Braz J Med Biol Res*, 1992. **25**(10): p. 975-82.
66. Herum, K.M., I.G. Lunde, A.D. McCulloch, and G. Christensen, *The Soft- and Hard-Heartedness of Cardiac Fibroblasts: Mechanotransduction Signaling Pathways in Fibrosis of the Heart*. *J Clin Med*, 2017. **6**(5).
67. Sohns, C. and N.F. Marrouche, *Atrial fibrillation and cardiac fibrosis*. *Eur Heart J*, 2020. **41**(10): p. 1123-1131.
68. Phipps, E.A., R. Thadhani, T. Benzing, and S.A. Karumanchi, *Pre-eclampsia: pathogenesis, novel diagnostics and therapies*. *Nat Rev Nephrol*, 2019. **15**(5): p. 275-289.
69. Tita, A.T., J.M. Szychowski, K. Boggess, L. Dugoff, B. Sibai, K. Lawrence, B.L. Hughes, J. Bell, K. Aagaard, R.K. Edwards, K. Gibson, D.M. Haas, L. Plante, T. Metz, B. Casey, S. Esplin, S. Longo, M. Hoffman, G.R. Saade, K.K. Hoppe, J. Foroutan, M. Tuuli, M.Y. Owens, H.N. Simhan, H. Frey, T. Rosen, A. Palatnik, S. Baker, P. August, U.M. Reddy, W. Kinzler, E. Su, I. Krishna, N. Nguyen, M.E. Norton, D. Skupski, Y.Y. El-Sayed, D. Ogunyemi, Z.S. Galis, L. Harper, N. Ambalavanan, N.L. Geller, S. Oparil, G.R. Cutter, and W.W. Andrews, *Treatment for Mild Chronic Hypertension during Pregnancy*. *N Engl J Med*, 2022. **386**(19): p. 1781-1792.
70. McLaughlin, K., R.R. Scholten, J.C. Kingdom, J.S. Floras, and J.D. Parker, *Should Maternal Hemodynamics Guide Antihypertensive Therapy in Preeclampsia?* *Hypertension*, 2018. **71**(4): p. 550-556.
71. von Dadelszen, P., M.P. Ornstein, S.B. Bull, A.G. Logan, G. Koren, and L.A. Magee, *Fall in mean arterial pressure and fetal growth restriction in pregnancy hypertension: a meta-analysis*. *Lancet*, 2000. **355**(9198): p. 87-92.
72. Bone, J.N., A. Sandhu, E.D. Abalos, A. Khalil, J. Singer, S. Prasad, S. Omar, M. Vidler, P. von Dadelszen, and L.A. Magee, *Oral Antihypertensives for Nonsevere Pregnancy Hypertension: Systematic Review, Network Meta- and Trial Sequential Analyses*. *Hypertension*, 2022. **79**(3): p. 614-628.
73. Solomon, C.G. and M.F. Greene, *Control of Hypertension in Pregnancy — If Some Is Good, Is More Worse?* *New England Journal of Medicine*, 2015. **372**(5): p. 475-476.
74. Magee, L.A., P. von Dadelszen, E. Rey, S. Ross, E. Asztalos, K.E. Murphy, J. Menzies, J. Sanchez, J. Singer, A. Gafni, A. Gruslin, M. Helewa, E. Hutton, S.K. Lee, T. Lee, A.G. Logan, W. Ganzevoort, R. Welch, J.G. Thornton, and J.-M. Moutquin, *Less-Tight versus Tight Control of Hypertension in Pregnancy*. *New England Journal of Medicine*, 2015. **372**(5): p. 407-417.
75. Podymow, T. and P. August, *Update on the use of antihypertensive drugs in pregnancy*. *Hypertension*, 2008. **51**(4): p. 960-9.
76. *National Institute for Health and Care Excellence: Guidelines, in Hypertension in pregnancy: diagnosis and management*. 2019, National Institute for Health and Care Excellence (NICE). Copyright © NICE 2019.: London. Retrieved from:

- <https://www.nice.org.uk/guidance/ng133/resources/hypertension-in-pregnancy-diagnosis-and-management-pdf-66141717671365>. Last retrieval date: 30-08-2023.
77. Saito, T., J. Ishida, E. Takimoto-Ohnishi, S. Takamine, T. Shimizu, T. Sugaya, H. Kato, T. Matsuoka, M. Nangaku, Y. Kon, F. Sugiyama, K. Yagami, and A. Fukamizu, *An essential role for angiotensin II type 1a receptor in pregnancy-associated hypertension with intrauterine growth retardation*. *Faseb j*, 2004. **18**(2): p. 388-90.
  78. Du, A.W. and M.H. Stenzel, *Drug carriers for the delivery of therapeutic peptides*. *Biomacromolecules*, 2014. **15**(4): p. 1097-114.
  79. Diao, L. and B. Meibohm, *Pharmacokinetics and pharmacokinetic-pharmacodynamic correlations of therapeutic peptides*. *Clin Pharmacokinet*, 2013. **52**(10): p. 855-68.
  80. Sato, A.K., M. Viswanathan, R.B. Kent, and C.R. Wood, *Therapeutic peptides: technological advances driving peptides into development*. *Curr Opin Biotechnol*, 2006. **17**(6): p. 638-42.
  81. Khan, F., K. Niaz, and M. Abdollahi, *Toxicity of Biologically Active Peptides and Future Safety Aspects: An Update*. *Curr Drug Discov Technol*, 2018. **15**(3): p. 236-242.
  82. Gupta, S., A. Jain, M. Chakraborty, J.K. Sahni, J. Ali, and S. Dang, *Oral delivery of therapeutic proteins and peptides: a review on recent developments*. *Drug Deliv*, 2013. **20**(6): p. 237-46.
  83. Svensen, N., J.G. Walton, and M. Bradley, *Peptides for cell-selective drug delivery*. *Trends Pharmacol Sci*, 2012. **33**(4): p. 186-92.
  84. Otvos, L., Jr. and J.D. Wade, *Current challenges in peptide-based drug discovery*. *Front Chem*, 2014. **2**: p. 62.
  85. Gembardt, F., S. Heringer-Walther, J.H. van Esch, A. Sterner-Kock, R. van Veghel, T.H. Le, I.M. Garrelds, T.M. Coffman, A.H. Danser, H.P. Schultheiss, and T. Walther, *Cardiovascular phenotype of mice lacking all three subtypes of angiotensin II receptors*. *Faseb j*, 2008. **22**(8): p. 3068-77.
  86. Iwai, N., T. Inagami, N. Ohmichi, Y. Nakamura, Y. Saeki, and M. Kinoshita, *Differential regulation of rat AT1a and AT1b receptor mRNA*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992. **188**(1): p. 298-303.
  87. Vercruyse, L., S. Caluwaerts, C. Luyten, and R. Pijnenborg, *Interstitial trophoblast invasion in the decidua and mesometrial triangle during the last third of pregnancy in the rat*. *Placenta*, 2006. **27**(1): p. 22-33.
  88. Caluwaerts, S., L. Vercruyse, C. Luyten, and R. Pijnenborg, *Endovascular trophoblast invasion and associated structural changes in uterine spiral arteries of the pregnant rat*. *Placenta*, 2005. **26**(7): p. 574-84.
  89. Pijnenborg, R., G. Dixon, W.B. Robertson, and I. Brosens, *Trophoblastic invasion of human decidua from 8 to 18 weeks of pregnancy*. *Placenta*, 1980. **1**(1): p. 3-19.
  90. Kräker, K., *Präeklampsie: Kardiovaskuläre Langzeitfolgen und potentielle Therapieansätze*. Thesis. 2019. Freie Universität Berlin.
  91. Brosnihan, K.B., L. Hering, R. Dechend, M.C. Chappell, and F. Herse, *Increased angiotensin II in the mesometrial triangle of a transgenic rat model of preeclampsia*. *Hypertension*, 2010. **55**(2): p. 562-6.
  92. Hering, L., F. Herse, N. Geusens, S. Verlohren, K. Wenzel, A.C. Staff, K.B. Brosnihan, B. Huppertz, F.C. Luft, D.N. Muller, R. Pijnenborg, J.E. Cartwright, and R. Dechend, *Effects of circulating and local uteroplacental angiotensin II in rat pregnancy*. *Hypertension*, 2010. **56**(2): p. 311-8.

93. Melchiorre, K., G.R. Sutherland, M. Liberati, and B. Thilaganathan, *Preeclampsia is associated with persistent postpartum cardiovascular impairment*. *Hypertension*, 2011. **58**(4): p. 709-15.
94. Joseph, G., Zaremba, T., Johansen, M. B., Ekloef, S., Heiberg, E., Engblom, H., Jensen, S. E., & Sogaard, P. (2019), *Echocardiographic global longitudinal strain is associated with infarct size assessed by cardiac magnetic resonance in acute myocardial infarction*. *Echo Research and Practice*, 6(4), 81-89.
95. Karlsen, S., T. Dahlslett, B. Grenne, B. Sjøli, O. Smiseth, T. Edvardsen, and H. Brunvand, *Global longitudinal strain is a more reproducible measure of left ventricular function than ejection fraction regardless of echocardiographic training*. *Cardiovasc Ultrasound*, 2019. **17**(1): p. 18.
96. Reineke, A., *Gentechnik: Grundlagen, Methoden und Anwendungen*. 2004: Ulmer.
97. Kedziora, S., *Characterization of the kidney injury during and after pregnancy in a transgenic rat model of preeclampsia*, in *Department of biochemistry and biology, University of Potsdam*. Thesis. 2019. University of Potsdam. p. 63.
98. Kedziora, S.M., K. Kräker, L. Markó, J. Binder, M. Sugulle, M. Gauster, D.N. Müller, R. Dechend, N. Haase, and F. Herse, *Kidney Injury Caused by Preeclamptic Pregnancy Recovers Postpartum in a Transgenic Rat Model*. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(7).
99. Menrad, K., S. Gaisser, B. Hüsing, and M. Menrad, *Gentechnik in der Landwirtschaft, Pflanzenzucht und Lebensmittelproduktion: Stand und Perspektiven*. 2013: Physica-Verlag HD.
100. technologies, I., *Real-time PCR handbook*. Retrieved from: <https://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf>. Last retrieval date: 30-08-2023
101. Di Gregorio, G.B., A. Yao-Borengasser, N. Rasouli, V. Varma, T. Lu, L.M. Miles, G. Ranganathan, C.A. Peterson, R.E. McGehee, and P.A. Kern, *Expression of CD68 and macrophage chemoattractant protein-1 genes in human adipose and muscle tissues: association with cytokine expression, insulin resistance, and reduction by pioglitazone*. *Diabetes*, 2005. **54**(8): p. 2305-13.
102. Kerkelä, R., J. Ulvila, and J. Magga, *Natriuretic Peptides in the Regulation of Cardiovascular Physiology and Metabolic Events*. *J Am Heart Assoc*, 2015. **4**(10): p. e002423.
103. Oh, S.Y., S.E. Song, E.S. Seo, K.H. Kim, S.J. Choi, Y.L. Suh, Y. Sadovsky, and C.R. Roh, *The expression of connective tissue growth factor in pregnancies complicated by severe preeclampsia or fetal growth restriction*. *Placenta*, 2009. **30**(11): p. 981-7.
104. Szabó, Z., J. Magga, T. Alakoski, J. Ulvila, J. Piuholo, L. Vainio, K.I. Kivirikko, O. Vuolteenaho, H. Ruskoaho, K.E. Lipson, P. Signore, and R. Kerkelä, *Connective tissue growth factor inhibition attenuates left ventricular remodeling and dysfunction in pressure overload-induced heart failure*. *Hypertension*, 2014. **63**(6): p. 1235-40.
105. Tops, L.F., V. Delgado, N.A. Marsan, and J.J. Bax, *Myocardial strain to detect subtle left ventricular systolic dysfunction*. *Eur J Heart Fail*, 2017. **19**(3): p. 307-313.
106. Smiseth, O.A., H. Torp, A. Opdahl, K.H. Haugaa, and S. Urheim, *Myocardial strain imaging: how useful is it in clinical decision making?* *Eur Heart J*, 2016. **37**(15): p. 1196-207.
107. Simmons, L.A., A.G. Gillin, and R.W. Jeremy, *Structural and functional changes in left ventricle during normotensive and preeclamptic pregnancy*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002. **283**(4): p. H1627-33.

108. Kräker, K., T. Schütte, J. O'Driscoll, A. Birukov, O. Patey, F. Herse, D.N. Müller, B. Thilaganathan, N. Haase, and R. Dechend, *Speckle Tracking Echocardiography: New Ways of Translational Approaches in Preeclampsia to Detect Cardiovascular Dysfunction*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(3).
109. Shahul, S., J. Rhee, M.R. Hacker, G. Gulati, J.D. Mitchell, P. Hess, F. Mahmood, Z. Arany, S. Rana, and D. Talmor, *Subclinical left ventricular dysfunction in preeclamptic women with preserved left ventricular ejection fraction: a 2D speckle-tracking imaging study*. *Circ Cardiovasc Imaging*, 2012. **5**(6): p. 734-9.
110. Dockree, S., J. Brook, B. Shine, T. James, L. Green, and M. Vatish, *Cardiac-specific troponins in uncomplicated pregnancy and pre-eclampsia: A systematic review*. *PLoS One*, 2021. **16**(2): p. e0247946.
111. Collet, J.-P., H. Thiele, E. Barbato, O. Barthélémy, J. Bauersachs, D.L. Bhatt, P. Dendale, M. Dorobantu, T. Edvardsen, T. Folliguet, C.P. Gale, M. Gilard, A. Jobs, P. Jüni, E. Lambrinou, B.S. Lewis, J. Mehilli, E. Meliga, B. Merkely, C. Mueller, M. Roffi, F.H. Rutten, D. Sibbing, G.C.M. Siontis, M. Chettibi, H.G. Hayrapetyan, B. Metzler, R. Najafov, V.I. Stelmashok, M. Claeys, Z. Kušljugić, P.M. Gatzov, B. Skoric, G. Panayi, M. Mates, R. Sorensen, K. Shokry, T. Marandi, O.A. Kajander, P. Commeau, A. Aladashvili, S. Massberg, D. Nikas, D. Becker, I.J. Guðmundsdóttir, A.J. Peace, R. Beigel, C. Indolfi, N. Aidargaliyeva, S. Elezi, M. Beishenkulov, A. Maca, O. Gustiene, P. Degrell, A. Cassar Maempel, V. Ivanov, P. Damman, S. Kedev, T.K. Steigen, J. Legutko, J. Morais, D. Vinereanu, D. Duplyakov, M. Zavatta, M. Pavlović, M. Orban, M. Bunc, B. Ibañez, R. Hofmann, O. Gaemperli, Y.B. Marjeh, F. Addad, E. Tutar, A. Parkhomenko, N. Karia, and E.S.D. Group, *2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC)*. *European Heart Journal*, 2020. **42**(14): p. 1289-1367.
112. Gronningsaeter, L., H. Skulstad, A. Quattrone, E. Langesaeter, and M.E. Estensen, *Reduced left ventricular function and sustained hypertension in women seven years after severe preeclampsia*. *Scand Cardiovasc J*, 2022. **56**(1): p. 292-301.
113. Borghi, C. and S. Omboni, *Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition: Beyond Blood Pressure Control-The Role of Zofenopril*. *Adv Ther*, 2020. **37**(10): p. 4068-4085.
114. Thayaparan, A.S., J.M. Said, S.A. Lowe, A. McLean, and Y. Yang, *Pre-eclampsia and long-term cardiac dysfunction: A review of asymptomatic cardiac changes existing well beyond the post-partum period*. *Australas J Ultrasound Med*, 2019. **22**(4): p. 234-244.
115. Ormesher, L., S. Higson, M. Luckie, S.A. Roberts, H. Glossop, A. Trafford, E. Cottrell, E.D. Johnstone, and J.E. Myers, *Postnatal Enalapril to Improve Cardiovascular Function Following Preterm Preeclampsia (PICK-UP):: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Feasibility Trial*. *Hypertension*, 2020. **76**(6): p. 1828-1837.
116. Van Kerckhoven, R., R. van Veghel, P.R. Saxena, and R.G. Schoemaker, *Pharmacological therapy can increase capillary density in post-infarction remodeled rat hearts*. *Cardiovasc Res*, 2004. **61**(3): p. 620-9.
117. Gupta, M.P., *Factors controlling cardiac myosin-isoform shift during hypertrophy and heart failure*. *J Mol Cell Cardiol*, 2007. **43**(4): p. 388-403.
118. Klos, M., L. Mundada, I. Banerjee, S. Morgenstern, S. Myers, M. Leone, M. Kleid, T. Herron, and E. Devaney, *Altered myocyte contractility and calcium homeostasis in*

- alpha-myosin heavy chain point mutations linked to familial dilated cardiomyopathy.* Arch Biochem Biophys, 2017. **615**: p. 53-60.
119. Carniel, E., M.R. Taylor, G. Sinagra, A. Di Lenarda, L. Ku, P.R. Fain, M.M. Boucek, J. Cavanaugh, S. Miodic, D. Slavov, S.L. Graw, J. Feiger, X.Z. Zhu, D. Dao, D.A. Ferguson, M.R. Bristow, and L. Mestroni, *Alpha-myosin heavy chain: a sarcomeric gene associated with dilated and hypertrophic phenotypes of cardiomyopathy.* Circulation, 2005. **112**(1): p. 54-9.
  120. Fang, J., Y. Li, K. Zhou, Y. Hua, C. Wang, and D. Mu, *Antithetical regulation of  $\alpha$ -myosin heavy chain between fetal and adult heart failure through shuttling of HDAC5 regulating YY-1 function.* Cardiovasc Toxicol, 2015. **15**(2): p. 147-56.
  121. Ikeda, Y., T. Nakamura, H. Takano, H. Kimura, J.E. Obata, S. Takeda, A. Hata, K. Shido, S. Mochizuki, and Y. Yoshida, *Angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy and cardiac fibrosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats.* J Lab Clin Med, 2000. **135**(4): p. 353-9.
  122. Dorn, L.E., J.M. Petrosino, P. Wright, and F. Accornero, *CTGF/CCN2 is an autocrine regulator of cardiac fibrosis.* Journal of molecular and cellular cardiology, 2018. **121**: p. 205-211.
  123. Sparks, M.A., F. Rianto, E. Diaz, R. Revoori, T. Hoang, L. Bouknight, J. Stegbauer, A. Vivekanandan-Giri, P. Ruiz, S. Pennathur, D.M. Abraham, S.B. Gurley, S.D. Crowley, and T.M. Coffman, *Direct Actions of AT(1) (Type 1 Angiotensin) Receptors in Cardiomyocytes Do Not Contribute to Cardiac Hypertrophy.* Hypertension, 2021. **77**(2): p. 393-404.
  124. Brown, N.J. and D.E. Vaughan, *Angiotensin-converting enzyme inhibitors.* Circulation, 1998. **97**(14): p. 1411-20.
  125. Brilla, C.G., R.C. Funck, and H. Rupp, *Lisinopril-mediated regression of myocardial fibrosis in patients with hypertensive heart disease.* Circulation, 2000. **102**(12): p. 1388-93.
  126. Leuschner, F., P. Panizzi, I. Chico-Calero, W.W. Lee, T. Ueno, V. Cortez-Retamozo, P. Waterman, R. Gorbato, B. Marinelli, Y. Iwamoto, A. Chudnovskiy, J.L. Figueiredo, D.E. Sosnovik, M.J. Pittet, F.K. Swirski, R. Weissleder, and M. Nahrendorf, *Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents the release of monocytes from their splenic reservoir in mice with myocardial infarction.* Circ Res, 2010. **107**(11): p. 1364-73.
  127. Vítovec, J. and J. Spinar, *First-dose hypotension after angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors in chronic heart failure: a comparison of enalapril and perindopril.* Slovak Investigator Group. Eur J Heart Fail, 2000. **2**(3): p. 299-304.
  128. Vítovec, J. and J. Spinar, *Heart failure and first dose hypotension after angiotensin converting enzyme inhibitors.* Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2004. **148**(2): p. 113-8.
  129. Spinar, J., J. Vitovec, L. Pluhacek, L. Spinarova, B. Fischerova, and J. Toman, *First dose hypotension after angiotensin converting enzyme inhibitor captopril and angiotensin II blocker losartan in patients with acute myocardial infarction.* Int J Cardiol, 2000. **75**(2-3): p. 197-204.
  130. Li, J., B. LaMarca, and J.F. Reckelhoff, *A model of preeclampsia in rats: the reduced uterine perfusion pressure (RUPP) model.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012. **303**(1): p. H1-8.
  131. Vogtmann, R., J. Heupel, F. Herse, M. Matin, H. Hagmann, I. Bendix, K. Kräker, R. Dechend, E. Winterhager, R. Kimmig, A. Königer, and A. Gellhaus, *Circulating*

- Maternal sFLT1 (Soluble fms-Like Tyrosine Kinase-1) Is Sufficient to Impair Spiral Arterial Remodeling in a Preeclampsia Mouse Model.* Hypertension, 2021. **78**(4): p. 1067-1079.
132. Kagan, L., J. Zhao, and D.E. Mager, *Interspecies pharmacokinetic modeling of subcutaneous absorption of rituximab in mice and rats.* Pharm Res, 2014. **31**(12): p. 3265-73.
133. Richter, W.F., S.G. Bhansali, and M.E. Morris, *Mechanistic determinants of biotherapeutics absorption following SC administration.* Aaps j, 2012. **14**(3): p. 559-70.
134. Van Norman, G.A., *Limitations of Animal Studies for Predicting Toxicity in Clinical Trials: Part 2: Potential Alternatives to the Use of Animals in Preclinical Trials.* JACC Basic Transl Sci, 2020. **5**(4): p. 387-397.
135. Ballester, P.J. and J.B.O. Mitchell, *A machine learning approach to predicting protein–ligand binding affinity with applications to molecular docking.* Bioinformatics, 2010. **26**(9): p. 1169-1175.
136. Gerdes, H., P. Casado, A. Dokal, M. Hijazi, N. Akhtar, R. Osuntola, V. Rajeeve, J. Fitzgibbon, J. Travers, D. Britton, S. Khorsandi, and P.R. Cutillas, *Drug ranking using machine learning systematically predicts the efficacy of anti-cancer drugs.* Nature Communications, 2021. **12**(1): p. 1850.
137. Li, Z., Y.W. Lam, Q. Liu, A.Y.K. Lau, H. Yu Au-Yeung, and R.H.M. Chan, *Machine Learning-Driven Drug Discovery: Prediction of Structure-Cytotoxicity Correlation Leads to Identification of Potential Anti-Leukemia Compounds.* Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc, 2020. **2020**: p. 5464-5467.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Yasmin Esmati, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Kardiovaskuläre Effekte eines maternalen Peptid-Antagonisten gegen den Angiotensin-II Typ-1 Rezeptor bei Ratten mit Präeklampsie“ / „Cardiovascular effects of a maternal peptide antagonist against the angiotensin II type-1 receptor in rats with preeclampsia“ 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/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://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.“

## **Lebenslauf**

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



## Komplette Publikationsliste

### ***Mutant Phosphodiesterase 3A Protects From Hypertension-Induced Cardiac Damage***

Circulation. 2022 Dec 6;146(23):1758-1778.

doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.122.060210. Epub 2022 Oct 19.

Maria Ercu, Michael B Mücke, Tamara Pallien, Lajos Markó, Anastasiia Sholokh, Carolin Schächterle, Atakan Aydin, Alexa Kidd, Stephan Walter, **Yasmin Esmati**, Brandon J McMurray, Daniella F Lato, Daniele Yumi Sunaga-Franze, Philip H Dierks, Barbara Isabel Montesinos Flores, Ryan Walker-Gray, Maolian Gong, Claudia Merticariu, Kerstin Zühlke, Michael Russwurm, Tiannan Liu, Theda U P Batolomaeus, Sabine Pautz, Stefanie Schelenz, Martin Taube, Hanna Napieczynska, Arnd Heuser, Jenny Eichhorst, Martin Lehmann, Duncan C Miller, Sebastian Diecke, Fatimunnisa Qadri, Elena Popova, Reika Langanki, Matthew A Movsesian, Friedrich W Herberg, Sofia K Forslund, Dominik N Müller, Tatiana Borodina, Philipp G Maass, Sylvia Bähring, Norbert Hübner, Michael Bader, Enno Klussmann

**IF: 39.918**

## Danksagung

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Ralf Dechend und Prof. Dr. Dominik N. Müller für die Möglichkeit bedanken, meine Doktorarbeit in ihrer Arbeitsgruppe durchführen zu können. Ich wurde sehr freundlich aufgenommen und in die Arbeitsgruppe integriert. Für die hervorragende Betreuung und die stets freundschaftliche und konstruktive Zusammenarbeit möchte ich mich insbesondere bei Frau Dr. Kristin Kräker bedanken. Ich möchte ihr auch für das Vertrauen und die Unterstützung danken, die letztlich zu einem äußerst förderlichen Arbeitsumfeld geführt hat. Sie war mir mit ihrem Einsatz und ihrem Engagement immer eine große Stütze. Auch Ihre wissenschaftliche und soziale Kompetenz ist einzigartig, weshalb ich sehr auf eine zukünftige Zusammenarbeit hoffe. Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Ralf Dechend, der mir Sachverhalte ausgezeichnet erklärt und mir in verschiedenen Fragen nützliche Hinweise gegeben hat. Auch bedanke ich mich für die Möglichkeit ein Empfehlungsschreiben auszustellen, welche ich zur Bewerbung eines Forschungspraktikum an der Oxford Universität benötigte und durch seine vielfache Unterstützung schließlich realisieren konnte. Außerdem möchte ich mich bei Frau Dr. Nadine Haase bedanken, dass sie mir dieses Projekt anvertraut hat und für mich stets ein offenes Ohr hatte. Weiterhin danke ich allen technischen Assistenten und Wissenschaftlern, die an den Tierversuchen beteiligt waren. Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie für ihre emotionale Unterstützung während des gesamten Projekts bedanken, insbesondere meiner liebevollen Mutter Najia Esmati und meinem stets hilfsbereiten Vater Nuragha Esmati. Ihr seid es, die Momenten wie diesen eine ganz besondere Bedeutung verleihen.

# 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. Frank Konietschke

Postanschrift:  
Charitéplatz 1 | 10117 Berlin  
Besucheranschrift:  
Sauerbruchweg 3 | 10117 Berlin

Tel. +49 (0)30 450 562175  
dario.zocholl@charite.de  
<https://biometrie.charite.de/>



**Name, Vorname: Esmati, Yasmin**  
**Emailadresse: yasmin.esmati@charite.de**  
**Matrikelnummer: 223725**  
**PromotionsbetreuerIn: Prof. Dr. Ralf Dechend**  
**Promotionsinstitution/Klinik: Experimental and Clinical  
Research Center (ECRC)**

## Bescheinigung

Hiermit bescheinige ich, dass Frau Yasmin Esmati 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: 10.11.2021
- Termin 2: 11.10.2022
- Termin 3: 18.01.2023

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

- Erklärung der Unterschiede zwischen klassischen statistischen Tests auf Gruppenunterschiede und Äquivalenztests zum Testen auf „Gleichheit“ zweier Gruppen.
- Geeignete statistische Modellierung wiederholter Messungen sowie deren post-hoc Tests.

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.

---

Unterschrift BeraterIn, Institutsstempel

---