

Aus der Franz-Volhard-Klinik  
der Medizinischen Fakultät der Charité -  
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Effekte des Antagonismus von  
Endothelin- und Angiotensin-  
Rezeptoren auf Kardiomyozyten bei  
experimenteller Herzinsuffizienz**

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

vorgelegt der  
Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Aarne Erik Feldheiser  
aus Zweibrücken

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. R. Willenbrock  
2. Priv.-Doz. Dr. med. W. Boemke  
3. Prof. Dr. med. V. Mitrovic

Datum der Promotion: 07.12.2007

## **Widmung**

Ich widme diese Arbeit meinen Eltern und danke ihnen für all ihre Unterstützung, Fürsorge, Geduld und Liebe.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>7</b>
1.1	Grundlagen der Herzinsuffizienz	7
1.1.1	Definition, Epidemiologie und Prognose der Herzinsuffizienz	7
1.1.2	Pathophysiologie, neurohumorale und prognostische Marker	7
1.1.3	Therapie der chronischen Herzinsuffizienz	9
1.2	Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	10
1.3	Das Endothelin-System	13
1.4	Fragestellung	14
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>16</b>
2.1	Versuchstiere	16
2.2	Experimentelles Herzinsuffizienzmodell	16
2.2.1	Anlage des aortokavalen Shunts	16
2.2.2	Applikation der Medikamente	18
2.2.3	Hämodynamische Messungen in vivo	20
2.2.4	Entnahme von Blut und Organen	20
2.3	Isolierung der Kardiomyozyten	21
2.3.1	Präparation und Langendorff-Perfusion des Herzen	21
2.3.2	Aufarbeitung des ventrikulären Gewebes	23
2.3.3	Aufarbeitung des atrialen Gewebes	24
2.3.4	Zählung der Kardiomyozyten in Suspension	24
2.4	Erfassung der Morphologie der isolierten atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten	26
2.5	Messung der Kontraktilität der isolierten Kardiomyozyten	27

2.6	Bestimmung von ANP und cGMP im Plasma	30
2.7	Statistische Auswertung und graphische Darstellung	31
<b>3</b>	<b>Versuchsergebnisse</b>	<b>33</b>
3.1	Versuchsverlaufsdaten	33
3.1.1	Überlebensdaten	33
3.1.2	Tiergewichte	34
3.1.3	Medikamentendosierungen	35
3.2	Herzkreislauf-Parameter	35
3.2.1	Hämodynamische Parameter	35
3.2.2	Organgewichte	38
3.2.3	Natriuretische Peptide	39
3.3	Zelluläre Parameter	40
3.3.1	Morphologie ventrikulärer Zellen	40
3.3.2	Morphologie atrialer Zellen	44
3.3.3	Kontraktionsparameter isolierter Kardiomyozyten	45
	a) Kontraktionsamplitude	45
	b) Anspannungsgeschwindigkeit	47
	c) Entspannungsgeschwindigkeit	49
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>51</b>
4.1	Hämodynamische Veränderungen des Shuntmodells	51
4.2	Zelluläre Veränderungen des Shuntmodells	52
4.3	Effekte einer AT <sub>1</sub> -Rezeptor-Blockade bei CHI	53
4.3.1	Einfluss einer AT <sub>1</sub> -Rezeptor-Blockade auf Organ- gewichte und Hämodynamik	53
4.3.2	Einfluss einer AT <sub>1</sub> -Rezeptor-Blockade auf zelluläre Parameter	54

4.4	Effekte einer ET <sub>A</sub> -Rezeptor-Blockade bei CHI	54
4.4.1	Einfluss einer ET <sub>A</sub> -Rezeptor-Blockade auf Organgewichte und Hämodynamik	54
4.4.2	Einfluss einer ET <sub>A</sub> -Rezeptor-Blockade auf zelluläre Parameter	56
4.5	Effekte einer kombinierten AT <sub>1</sub> - und ET <sub>A</sub> -Rezeptor-Blockade bei CHI	58
4.5.1	Einfluss einer kombinierten AT <sub>1</sub> - und ET <sub>A</sub> -Rezeptor-Blockade auf Organgewichte und Hämodynamik	58
4.5.2	Einfluss einer kombinierten AT <sub>1</sub> - und ET <sub>A</sub> -Rezeptor-Blockade auf zelluläre Parameter	59
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>63</b>
<b>6</b>	<b>Schlagwörter</b>	<b>65</b>
<b>7</b>	<b>Keywords</b>	<b>65</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>66</b>
<b>9</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>78</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung</b>	<b>81</b>
<b>11</b>	<b>Curriculum Vitae</b>	<b>82</b>
<b>12</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>84</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Grundlagen der Herzinsuffizienz

### 1.1.1 Definition, Epidemiologie und Prognose der Herzinsuffizienz

Chronische Herzinsuffizienz (CHI) ist als pathophysiologischer Zustand aufzufassen, bei der das Herz nur bei erhöhten Füllungsdrücken in der Lage ist, die notwendige Versorgung der Gewebe mit Sauerstoff und Substraten zu gewährleisten<sup>1,2</sup>.

Trotz zunehmend verbesserter Therapiemöglichkeiten ist die Prognose der CHI schlecht. Die Mortalität beträgt innerhalb von fünf Jahren 50 %. Sie weist eine Abhängigkeit von den Stadien nach der New York Heart Association (NYHA) auf und ist rund 20 % im ersten Jahr für Stadium III und 65 % für Stadium IV. Die Framingham-Studie zeigte mittlere Überlebenszeiten von 1,7 Jahren für Männer und 3,2 Jahren für Frauen<sup>3</sup>, welches der Prognose einer aggressiven, malignen Tumorerkrankung entspricht<sup>4</sup>.

Die Prävalenz wird in Europa mit 0,4 bis 2,0 % der Bevölkerung beziffert und zeigt eine Zunahme mit steigendem Alter, so dass ein 85-jähriger eine 30- bis 80-fach höhere Wahrscheinlichkeit besitzt an einer CHI zu erkranken als ein 50-jähriger.

Aufgrund der hohen Prävalenz, Morbidität und Mortalität der CHI ist weitere Forschung auf dem Gebiet der therapeutischen Möglichkeiten dringend erforderlich<sup>5</sup>.

### 1.1.2 Pathophysiologie, neurohumorale und prognostische Marker

Eine herabgesetzte kardiale Pumpfunktion durch verminderte myokardiale Kontraktilität oder eine erhöhte Wandspannung des Ventrikels durch erhöhte Vor- oder Nachlast führt zu einer Reduktion des Schlagvolumens. Als Folge kommt es zu einer Aktivierung des sympathischen Nervensystems (SNS) mit erhöhter Katecholaminausschüttung und zu einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) mit nachfolgender Natrium- und Wasserretention (siehe Kapitel 1.2). Dies führt zu einer Steigerung der Vor- und Nachlast und zu einer myokardialen Hypertrophie mit Umbauvorgängen des Myokards auf zellulärer und molekularer Ebene (Remodeling). Diese Kompensationsmechanismen erhalten im Frühstadium

der Erkrankung das Herzminutenvolumen, den Blutdruck und die Durchblutung lebenswichtiger Organe aufrecht. Im Spätstadium der Erkrankung kommt es durch das SNS und das RAAS durch eine Erhöhung der Vorlast und Nachlast zu einem Abfall des Herzminutenvolumens und zu einer herabgesetzten Pumpfunktion bei insgesamt unökonomischer Herzarbeit<sup>6-9</sup>.

Mit Fortschreiten der CHI tritt eine Ineffizienz der kompensierenden Wirkung des SNS aufgrund von  $\beta$ -Rezeptoren-Downregulation am Herzen und ein direkt toxischer Effekt von Noradrenalin (NA) auf Kardiomyozyten auf. Dabei ist der NA-Plasmaspiegel ein unabhängiger, prognostischer Wert für die Mortalität der CHI<sup>7, 9, 10</sup>.

Neuroendokrine Faktoren		Rezeptoren	Effekte am Herzen	Andere Effekte
SNS	NA	$\alpha_1, \beta_1, \beta_2$	Inotropie, Chronotropie, Dromotropie, Lusitropie, Myozytenhypertrophie und Zelltod	Vasokonstriktion, Renin-Stimulation
RAAS	Ang II	AT <sub>1</sub> , AT <sub>2</sub>	Inotropie (AT <sub>1</sub> ), myokardiale Hypertrophie (AT <sub>1</sub> ), Apoptose (AT <sub>2</sub> )	Vasokonstriktion (AT <sub>1</sub> ), Natrium-Retention (AT <sub>1</sub> ), Aldosteron-Stimulation
	Ald.	Ald.-Rez.	Myokardiale Fibrose	Natrium-Retention
Vasopressin		V <sub>1</sub> , V <sub>2</sub>	-	Vasokonstriktion (V <sub>1</sub> ), Wasser-Retention (V <sub>2</sub> )
Endothelin-1		ET <sub>A</sub> , ET <sub>B</sub>	Kardiomyozytenhypertrophie (ET <sub>A</sub> )	Vasokonstriktion (ET <sub>A</sub> )
ANP		NP-A, -B, -C	Antihypertrophie der Kardiomyozyten	Natriurese, Vasodilatation
BNP		NP-A, -B, -C	-	Natriurese, Vasodilatation

**Tabelle 1.1:** Neuroendokrine Faktoren, deren Rezeptoren und Effekte am Herzen und an anderen Organen.

(Ang II): Angiotensin II; (AT): Angiotensin-Rezeptoren; (Ald.): Aldosteron; (V<sub>1</sub>, V<sub>2</sub>): Vasopressin-Rezeptoren; (ET<sub>A</sub>, ET<sub>B</sub>): Endothelin-Rezeptoren; (NP-A, -B, -C): Natriuretische Peptid-Rezeptoren Typ-A, -B und -C.



Des Weiteren besteht eine Aktivierung der endokrinen Funktion des Herzens durch die natriuretischen Peptide (NP) mit erhöhten Plasmaspiegeln des „atrial natriuretic peptide“ (ANP) und des „brain natriuretic peptide“ (BNP)<sup>11</sup>. Die Wirkung als endogener Antagonist der NP's zum RAAS und zum Vasopressin ist bei CHI abgeschwächt<sup>12</sup>. Ausdruck dessen sind erhöhte Quotienten des ANP zu seinem intrazellulärem second messenger zyklisches Guaninmonophosphat (cGMP) im Plasma<sup>13</sup>. BNP ist ein unabhängiger, prognostischer Marker der Mortalität der CHI und ist geeignet zur Verlaufskontrolle der Erkrankung<sup>14, 15</sup>. Das Endothelin als stärkstes vasokonstriktorisches Peptid des Körpers ist ein weiteres Hormon, das an der Pathophysiologie der CHI beteiligt ist (siehe Kapitel 1.3, Übersicht über die beteiligten neurohumoralen Systeme in Tabelle 1.1).

### 1.1.3 Therapie der chronischen Herzinsuffizienz

Neben allgemeinen, nichtmedikamentösen Maßnahmen wie Gewichtsreduktion, Salz- und Wasserrestriktion<sup>2</sup> richtet sich die Indikation einer Therapie der CHI nach der klinischen Einteilung der Belastbarkeit eines Patienten durch die Kriterien der New York Heart Association (NYHA). Dabei konnte für Angiotensin-Konversionsenzym-Hemmer<sup>16-19</sup>,  $\beta$ -Blocker<sup>20-22</sup> und Aldosteron-Antagonisten<sup>23</sup> eine positive Wirkung auf das Überleben von CHI nachgewiesen werden. Diese sind damit gemäß der vorhandenen Studien für die jeweiligen klinischen Grade der CHI indiziert (Tabelle 1.2). Soweit der Zustand des Patienten es zulässt, ist körperliches Training eine suffiziente Maßnahme zur Verbesserung der Klinik<sup>24</sup>. Die Resynchronisationstherapie durch biventrikuläres Pacing ist zu indizieren zur Behandlung von begleitenden Blockbildern im Erregungsablauf des Herzens. Als weitreichendste und letzte Therapieoption ist die Herztransplantation anzusehen. Sie ist aber erst in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung indiziert.<sup>25</sup> Als kurzfristige Überbrückungsmaßnahme einer dekompensierten CHI sind Assist-Systeme aufzufassen<sup>26</sup>.

Digitalisglykoside werden eingesetzt, da sie Morbidität und Lebensqualität der Patienten verbessern, ohne einen Einfluss auf die Mortalität zu haben<sup>27</sup>. Des Weiteren werden Digitalisglykoside im Rahmen von Vorhofflimmern bei CHI zur Frequenzkontrolle eingesetzt.

Diuretika führen zu einer Verbesserung der Hämodynamik durch Salz- und Wasserausscheidung mit konsekutiver Herabsetzung der Vorlast<sup>2</sup>.

Klinik	Indizierte Therapien der CHI
in allen Stadien	Nichtmedikamentöse Maßnahmen <sup>24</sup>
	ACE-Hemmer <sup>16-19</sup> (bei Unverträglichkeit AT <sub>1</sub> -R-Antagonisten)
zusätzlich ab NYHA II	β-Blocker <sup>20-22</sup>
zusätzlich ab NYHA III	Aldosteron-Antagonisten <sup>23</sup>
	Digitalisglykoside <sup>27</sup>
	Diuretika
zusätzlich ab NYHA IV	HTx, Assist Systeme

**Tabelle 1.2:** Therapieindikationen der CHI nach NYHA-Einteilung mit Studienbeispielen.

(NYHA): New York Heart Association; (HTx): Herztransplantation; (ACE): Angiotensin-Konversionsenzym; (AT<sub>1</sub>-R-Antagonist): Angiotensin II-Typ 1-Rezeptor-Antagonist.

Neben diesen etablierten Pfeilern der Therapie der CHI konnten einige weitere Medikamentengruppen wie z.B. Rezeptor-Antagonisten für Endothelin (siehe Kapitel 1.3), Neutrale Endopeptidase-Hemmer und Vasopeptidase-Inhibitoren<sup>28-30</sup> oder Medikamente, die in die Signaltransduktion von Tumornekrose-Faktor-α eingreifen<sup>31</sup> keine Wirksamkeit in Bezug auf das Überleben der Patienten zeigen.

## 1.2 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Das RAAS ist ein ubiquitär vorkommendes Hormonsystem, das in die Homöostase des Elektrolyt- und Wasser-Haushaltes und in die Regulation des Herz-Kreislaufsystems eingebunden ist. Durch enzymatische Spaltung von dem in der Leber synthetisierten Angiotensinogen durch Renin im Plasma kommt es zur Bildung von Angiotensin I. Das Angiotensin-Konversionsenzym (ACE) spaltet dieses zur biologisch aktiven Form Angiotensin II.

Das zu großen Teilen in der Lungenstrombahn befindliche ACE konvertiert aber nicht nur Angiotensin I zum Angiotensin II, sondern ist auch an der Umwandlung anderer vasoaktiver Peptide – wie Bradykinin und Prostazykline – von ihrer biologisch aktiven in ihre inaktive Form beteiligt. Bradykinin und Prostazykline wirken über eine Aktivierung des NO-Systems antagonistisch zum Angiotensin II <sup>32-36</sup>.

Angiotensin II ist an der Regulation des Gefäßtonus durch Vasokonstriktion der Arteriolen, der Vasopressin- und Aldosteronsekretion sowie der Natrium- und Wasserretention und an der Sympathikusaktivierung und der Gerinnung beteiligt. Am Herzen kann es zu einer zellulären Hypertrophie, einer myokardialen Fibrose und Apoptose im Rahmen des Remodeling sowie zu einer proarrhythmogenen und positiv inotropen Wirkung beitragen. An den Blutgefäßen kann Angiotensin II eine Gefäßmuskelhypertrophie, eine gesteigerte Endothelin-Sekretion und eine Aktivierung der Monozyten hervorrufen. Damit ist das Angiotensin II ein wesentlicher Regulationsfaktor des Herz-Kreislaufsystems <sup>32-36</sup>.

Es wurden bisher vier Angiotensin II- Rezeptoren identifiziert, die als Angiotensin II-Typ 1-Rezeptor (**AT<sub>1</sub>-R**), AT<sub>2</sub>-R, AT<sub>3</sub>- R und AT<sub>4</sub>- R bezeichnet werden. Die klassischen Effekte des Angiotensin II (Vasokonstriktion, Natrium- und Wasser-Retention und kardiovaskuläres Remodeling) werden durch den AT<sub>1</sub>-R vermittelt <sup>35-37</sup>. Der AT<sub>2</sub>-R spielt eine wesentliche Rolle während der fetalen Entwicklung. Nach der Geburt wird er nur noch in pathologischen Situationen exprimiert, in denen er an der Vermittlung der zellulären Hypertrophie und des Remodeling beteiligt sein könnte <sup>35-42</sup>. Die anderen Angiotensin II- Rezeptoren sind bisher nur unzureichend charakterisiert <sup>33</sup>.

Es konnte gezeigt werden, dass AT<sub>1</sub>-R-Antagonisten zu einer arteriellen Vasodilatation, einer Erhöhung des Herzminutenvolumens und antiproliferativen Effekten auf Gefäß- und Herzmuskelzellen führen <sup>43, 44</sup>. Des weiteren bewirken sie eine gleichzeitige Inhibierung des SNS und anderer Hormone wie Vasopressin und Aldosteron und konnten die Überlebenszeit im Tiermodell erhöhen <sup>45, 46</sup>. Ebenso lag eine den ACE-Hemmern vergleichbare therapeutische Beeinflussbarkeit der Progredienz der CHI vor <sup>47</sup>. In der Behandlung der essentiellen, arteriellen Hypertonie sind sie eine anerkannte Therapieoption <sup>28, 48-50</sup>. Bei kurzzeitigen Studien von Patienten mit CHI zeigte

sich eine gute Verträglichkeit der AT<sub>1</sub>-R-Antagonisten mit einer Verbesserung der Hämodynamik und den klinischen Zeichen der Patienten<sup>51-53</sup>.

Seit der CONSENSUS-Studie<sup>18</sup> ist die Inhibition des RAAS fester Bestandteil der Therapie der CHI und wurde durch weitere Studien bestätigt<sup>16, 17, 19</sup>. Diese Studien erfolgten mit ACE-Hemmern. Eine längerfristige Gabe dieser ACE-Hemmer bewirkte einen Abfall der Angiotensin II-Plasmaspiegel, die aber nach fortgeführter Therapie wieder auf die Plasmalevel vor Beginn der Intervention anstiegen. Verantwortlich dafür soll eine Spaltung des Angiotensin I durch alternative, nicht geblockte Enzyme der entsprechenden Gewebe sein<sup>32, 35</sup>. Ausdruck dessen ist ebenfalls, dass sich die Aldosteron-Plasmaspiegel bei Blockade der Synthese von Angiotensin II durch ACE-Hemmer in manchen Patienten nicht senken. Erhöhte Aldosteron-Werte werden mit dafür verantwortlich gemacht, dass es zu einer Progredienz der Hypertrophie unter ACE-Hemmer-Therapie kommen kann<sup>54, 55</sup>.

AT<sub>1</sub>-R-Antagonisten hingegen zeigten weniger Nebenwirkungen als ACE-Hemmer, weil bei ihnen der häufige, trockene Reizhusten und das potentiell lebensbedrohliche Angio-Ödem sehr selten vorkommen<sup>33, 56</sup>. Dies wird damit erklärt, dass keine Interaktion mit Bradykinin und Prostazyklinen erfolgt, wobei möglicherweise aber auch positive Therapieeffekte verloren gehen könnten.

Studien mit Losartan, Valsartan und Candesartan bei CHI zeigten, dass die AT<sub>1</sub>-R-Antagonisten den ACE-Hemmern nicht über- oder unterlegen sind (ELITE I, II<sup>57</sup> und OPTIMAAL<sup>58</sup> für Losartan; VALIANT<sup>59</sup> für Valsartan; das CHARM-Programm<sup>60-63</sup> für Candesartan). Eine Meta-Analyse aller Studien mit AT<sub>1</sub>-R-Antagonisten zeigte eine mit ACE-Hemmern vergleichbare Wirkung<sup>64</sup>.

Subgruppen von Val-HeFT<sup>65</sup>, die keinen ACE-Hemmer erhielten, CHARM-alternative<sup>62</sup> und VALIANT<sup>59</sup> zeigten, dass AT<sub>1</sub>-R-Antagonisten eine gute Alternative für Patienten mit CHI oder akutem Myokardinfarkt sind, die einen ACE-Hemmer nicht tolerieren. Zudem ergaben sich aus CHARM-added Hinweise auf einen positiven Nutzen einer zusätzlichen AT<sub>1</sub>-R-Blockade zu einer bestehenden ACE-Hemmer-Therapie bei CHI<sup>61</sup>.

Aufgrund der pathophysiologischen Bedeutung des RAAS bei der chronischen Herzinsuffizienz wurde in dieser Arbeit eine Inhibition mit dem AT<sub>1</sub>-R-Antagonisten Candesartan durchgeführt. Dieses ermöglichte die Blockade

des RAAS direkt an den Rezeptoren ohne Wechselwirkung mit anderen vasoaktiven Peptiden wie bei einer Therapie mit ACE-Hemmern.

### 1.3 Das Endothelin-System

Seit der Erstbeschreibung des Endothelins (ET) durch Yanagisawa et al.<sup>66</sup> als Vasokonstriktor konnte eine Vielzahl weiterer Wirkungen im kardiovaskulären und immunologischen System sowie im Gehirn gezeigt werden. Bis dato sind drei Peptide beschrieben (ET-1, ET-2 und ET-3), die jeweils aus 21 Aminosäuren zusammengesetzt sind und von separaten Genabschnitten exprimiert werden<sup>67</sup>.

Im kardiovaskulären System findet sich vor allem ET-1. Es wird verstärkt im Herzen und in der Gefäßmuskulatur exprimiert und seine Freisetzung unter anderem durch Zytokine, Interleukin-1, Low-Density-Lipoproteine, Hypoxie, Thrombin, Insulin und anderen vasoaktiven Substanzen bewirkt. NO, Prostaglandine, Prostazykline und ANP inhibieren die Freisetzung von ET-1<sup>68, 69</sup>. ET-1 wird zu 80% abluminal sezerniert, besitzt eine kurze Halbwertszeit im Blut und wirkt primär als auto- und parakrines Peptid. Die Hauptquelle des im Plasma befindlichen ET-1 scheint die Lungenstrombahn zu sein<sup>68</sup>.

Es sind bisher zwei Rezeptoren des Endothelin-Systems beschrieben. Über den Endothelin-Typ-A-Rezeptor (ET<sub>A</sub>-R) bewirkt ET-1 eine Vaso- und Bronchokonstriktion sowie eine Kontraktion des Uterus. Über den Endothelin-Typ-B-Rezeptor (ET<sub>B</sub>-R) wird eine Endothel-abhängige Vasorelaxation und eine Inhibition der Plättchenaggregation durch Freisetzung von NO und Prostazyklinen vermittelt. Des weiteren wurde eine antiarrhythmische Wirkung auf das Myokard und die Eliminierung von zirkulierendem ET-1 beschrieben<sup>67</sup>.

In Patienten mit CHI korrelieren die Plasma ET-1-Spiegel zur klinischen NYHA-Einteilung und zum Ausmaß der kardialen Schädigung. Nach einem akutem Myokardinfarkt sind erhöhte Endothelin-Plasma-Spiegel ein prognostischer Faktor für eine erhöhte Langzeit-Sterblichkeit<sup>70, 71</sup>.

In mehreren Tiermodellen konnten sowohl unselektive Endothelin-Rezeptor-Antagonisten (ET<sub>A/B</sub>-R-Antagonist) als auch selektive Endothelin-Typ-A-Rezeptor-Antagonisten (ET<sub>A</sub>-R-Antagonist) das Überleben verbessern, eine progressive Dilatation der Ventrikel verhindern und die intrakardialen Drücke

und die Nachlast senken sowie den renalen Blutfluss erhöhen<sup>72-74</sup>. Selektive Endothelin-Typ-B-Rezeptor-Antagonisten (**ET<sub>B</sub>-R-Antagonist**) bewirkten stattdessen einen Anstieg der intrakardialen Drücke und senkten das Herzminutenvolumen und den renalen Blutfluss<sup>73</sup>.

Für die Therapie der pulmonalen Hypertonie konnte Bosentan eine Verbesserung der klinischen Symptomatik zeigen und ist zugelassen und indiziert<sup>75, 76</sup>.

Blockade des ET<sub>A</sub>-R und ET<sub>B</sub>-R durch Bosentan bei Patienten mit CHI führte langfristig zu einer Verbesserung der Klinik und den Krankheitsverlauf, wobei allerdings die Transaminasen erhöht waren<sup>77</sup>. In einer nachfolgenden Studie mit niedrigerer Dosierung konnte kein Effekt auf die Sterblichkeit gezeigt werden. Außerdem wurde ein erhöhtes Risiko für eine Krankenhausaufnahme wegen Verschlechterung der CHI aufgrund einer Wasserretention mit erhöhtem Körpergewicht, peripheren Ödemen und Abfall des Hämoglobins verzeichnet<sup>28, 78, 79</sup>.

Die negativen Effekte einer kombinierten Blockade der ET<sub>A</sub>-R und ET<sub>B</sub>-R könnten die Folge des ET<sub>B</sub>-R Antagonismus sein. Somit sind Studien mit ET<sub>A</sub>-R-Antagonisten abzuwarten, die den positiven Effekt der Aktivierung des ET<sub>B</sub>-R mit Vasodilatation und Elimination von zirkulierendem ET-1 nutzen. So konnte eine Studie mit Darusentan, einem ET<sub>A</sub>-R-Antagonisten, eine Verbesserung des Herzindex nach einer dreiwöchigen Therapie vorweisen<sup>80</sup>.

Aufgrund der nachgewiesenen Bedeutung des ET-Systems bei Herzinsuffizienz wurde in dieser Arbeit eine Inhibition der ET<sub>A</sub>-R durchgeführt.

#### **1.4 Fragestellung**

Der aortokavale Shunt an der Ratte ist ein etabliertes Modell für die experimentelle Herzinsuffizienz. Nicht beschrieben ist bisher, ob es zu einer zellulären Hypertrophie und einer verringerten Kontraktionsantwort der Kardiomyozyten kommt. Zusätzlich sollen die zellulären Veränderungen mit dem Ausmaß der myokardialen Hypertrophie und hämodynamischen Parametern erfolgen. Dies soll an diesem Modell die Grundlage bilden für die Untersuchung von Therapieeffekten auf zelluläre Parameter.

Bei der chronischen Herzinsuffizienz findet sich eine ausgeprägte Aktivierung des RAAS und des Endothelin-Systems, die im Verlauf der

Erkrankung zu deren Progression beiträgt und deletäre Effekte zeigt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Blockierung des RAAS und des Endothelin-Systems zu einer Verbesserung der Hämodynamik führen kann. Unbekannt ist bisher, ob es sich um systemische und / oder direkte kardiomyozytäre Effekte – z.B. in Form einer Verbesserung der Kontraktionseigenschaften einzelner Kardiomyozyten – handelt. Diese Arbeit soll zusätzlich untersuchen, ob sich bei den beschriebenen antihypertrophen Effekten der Therapien auf das Herzgewicht auch um eine Reduktion der Hypertrophie auf Ebene der Kardiomyozyten findet.

Für die Blockade der Endothelin- und der Angiotensin-Rezeptoren sind additive Effekte in Bezug auf die Hämodynamik beschrieben worden. Diese Arbeit soll der Frage nachgehen, ob sich synergistische Effekte auch in Bezug auf die zellulären Parameter der Hypertrophie und der Kontraktionscharakteristika zeigen.

Des Weiteren soll untersucht werden, ob sich Unterschiede in der rezeptorvermittelten Regulierung der Hypertrophie durch Angiotensin und Endothelin zwischen ventrikulären und atrialen Kardiomyozyten finden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere

Für die Experimente wurden zur Untersuchung 235 - 245 g schwere männliche Wistar-Ratten (Tierzucht Schönwalde, Schönwalde, Deutschland) untersucht. Alle Tiere wurden in einem klimatisierten Raum mit konstanter Luftfeuchtigkeit und einer Temperatur von 23 Grad Celsius (° C) gehalten. Es herrschte ein 12 Stunden (h) Tag/Nacht-Rhythmus. Trinkwasser und Nahrung (Ssniff Experimentalfutter, Fa. Ssniff, Soest, Deutschland) wurden zur freien Verfügung bereitgestellt. Hämodynamische Messungen, sowie Organ- und Blutentnahmen wurden zwischen 7 und 15 Uhr durchgeführt.

Nach einer Versuchsdauer von  $28 \pm 2$  Tage nach Anlage des aortokavalen Shunts wurden alle Parameter erhoben. Bei den Versuchen wurden 20 - 23 Tiere pro Versuchsgruppe zur Erfassung der hämodynamischen und der natriuretischen Peptide sowie der Organgewichte eingesetzt. Zur Bestimmung der zellulären Morphologie wurden die Daten von 11 - 12 Tieren erfasst. Die Messung der Kontraktionsanalyse wurden von 8 - 9 Tiere pro Versuchsgruppe durchgeführt.

Die Tierversuche wurden von der Senatsverwaltung für Gesundheit und Soziales in Berlin unter der Tierversuchsnummer G 0262/96 (vom 14.11.1996) genehmigt.

### 2.2 Experimentelles Herzinsuffizienzmodell

#### 2.2.1 Anlage des aortokavalen Shunts

Der aortokavale Shunt wurde mit einer Operationstechnik modifiziert nach Garcia und Diebold angelegt<sup>81, 82</sup>. Dabei wurde unter einer Äthernarkose (Diethyläther, Otto Fischer GmbH, Saarbrücken, Deutschland) die Bauchhaut rasiert und mit einer 70%-igen Ethanollösung desinfiziert. Mittels eines Medianschnittes wurde die Bauchhöhle

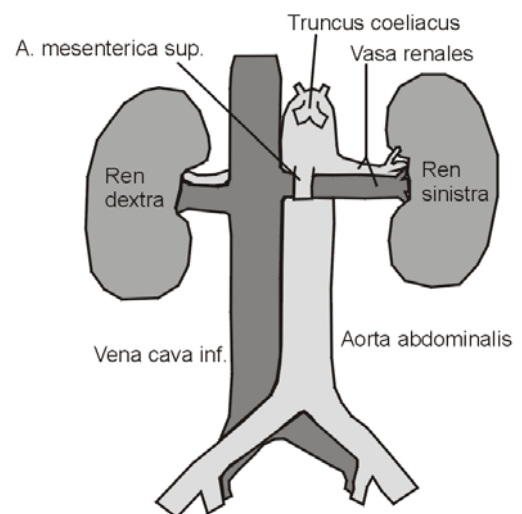


Abbildung 2.1: Darstellung der anatomischen Verhältnisse



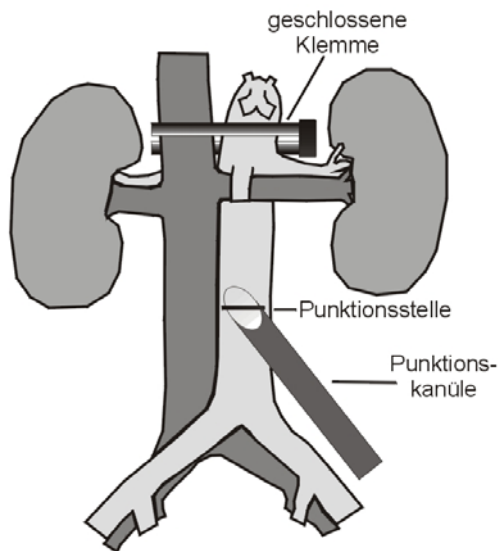


Abbildung 2.2: Punktion der proximal abgeklemmten Aorta abdominalis

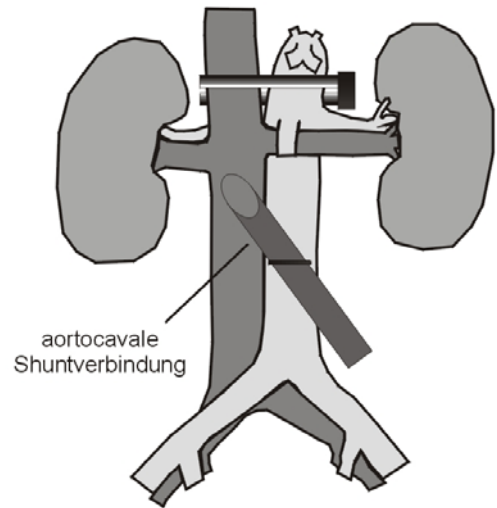


Abbildung 2.3: Punktion der Vena cava inf. über die Aorta abdominalis

eröffnet und die Aorta abdominalis mit der Vena cava inferior in ihrer Bindegewebsscheide dargestellt ([Abbildung 2.1](#)). Kurz oberhalb der Nierengefäßabgänge wurde die Aorta abdominalis, nach Trennung von der Vena cava inferior, mit einer Bulldockklemme abgeklemmt. Mit Hilfe einer Strauß-Kanüle ( $\varnothing$  1,8 mm Braun, Melsungen, Deutschland) wurde zunächst die Aorta punktiert ([Abbildung 2.2](#)) und die Strauß-Kanüle dann über die Aorta in die Vena cava inferior vorgeführt ([Abbildung 2.3](#)).

Nach Herausziehen der Kanüle wurde die oberflächliche Punktionsstelle der Aorta mit einem Zyanoakrylkleber ([Instant Crazy Glue, Borden Company, Willowdale, Ontario, Kanada](#)) verschlossen ([Abbildung 2.4](#)). Währenddessen wurde die Aorta abdominalis und die Vena cava inferior manuell komprimiert, um die aortale Punktionsstelle blutfrei zu halten, damit der

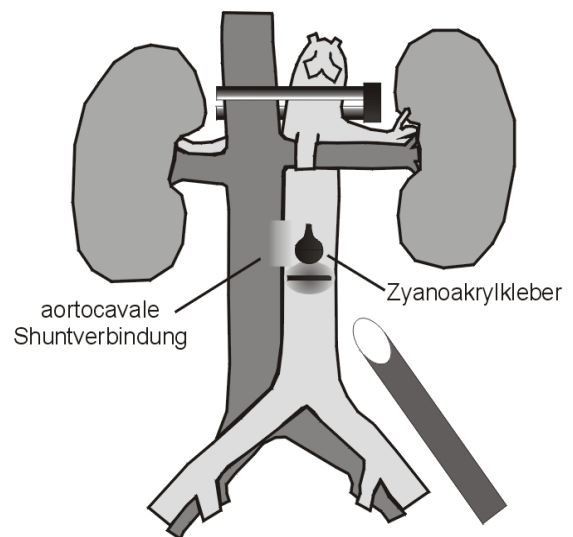


Abbildung 2.4: Entfernen der Punktionsnadel und Verschluss der Punktionsstelle

Kleber trocken konnte. Nach einer Trocknungszeit des Klebstoffes von etwa 30 Sekunden wurde die proximal liegende Klemme gelöst und damit die Perfusion der Aorta wieder freigegeben.

Das Shuntvolumen wurde visuell durch das Anschwellen und eine hellrote Verfärbung der Vena cava inferior aufgrund der Zumischung arteriellen Blutes beurteilt (Abbildung 2.5).

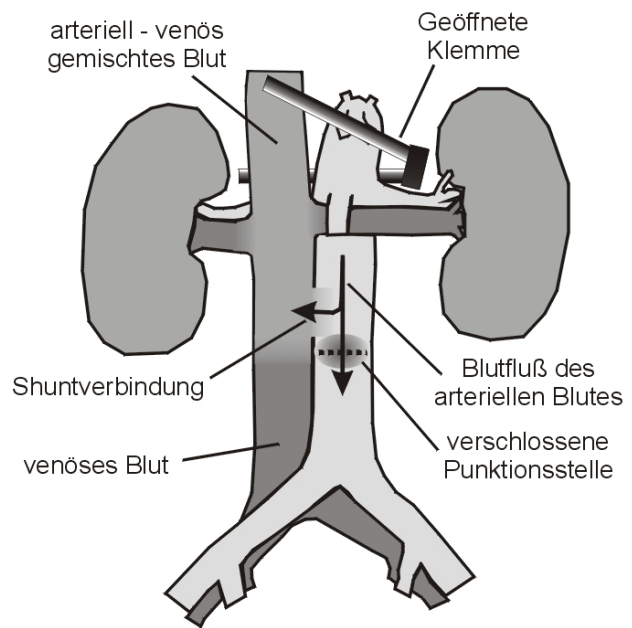


Abbildung 2.5: Hellfärbung des venösen Blutes durch das geschuntete Volumen

Anschließend wurde die Bauchhöhle schichtweise mit sterilen Einzelknopfnähten verschlossen (Perma Hand Seide, 3-0, Ethicon, Norderstedt, Deutschland). Die schein-operierte Kontroll-Gruppe wurde bis auf die Punction der Aorta abdominalis und der Vena cava inferior identisch operiert.

Die perioperative Mortalität innerhalb der ersten zwei Tage war zwischen der Shunt- und der Kontroll-Gruppe nicht unterschiedlich (< 3%).

Die hämodynamischen Messungen, Blut- und Organentnahmen wurden  $28 \pm 2$  Tage nach Shunt-Induktion durchgeführt. Es wurde eine scheinoperierte Kontrollgruppe (Kontroll-Gruppe) mit Gruppen shuntoperierter Tiere verglichen, die verschiedene Therapien erhielten – wie unter 2.2.2 beschrieben. Das Körpergewicht der Tiere wurde dreimal pro Woche erfasst.

### 2.2.2 Applikation der Medikamente

Jedes Tier wurde vor seiner Operation zur Shuntanlage einer Therapiegruppe von einer Person zugeordnet, die nicht an der Shuntoperation beteiligt war. Dadurch wurde eine Randomisierung der Tiere in Bezug auf die Größe des Shunts zu den Therapiegruppen erreicht. Ab dem ersten postoperativen Tag erhielten alle Therapiegruppen ihre Medikation mit dem Trinkwasser, das ab libitum in ausreichender Menge täglich bereitgestellt wurde.

Eine Gruppe shuntoperierter Tiere erhielt Leitungswasser, das mit einem Milliliter physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %, Braun, Melsungen) auf 100ml versetzt wurde (Vehikel-Gruppe). Eine zweite Gruppe shuntoperierter Tiere erhielt Trinkwasser mit 4 mg Darusentan-Zusatz (Knoll GmbH, Ludwigshafen, Deutschland) pro 100 ml Leitungswasser (Darusentan-Gruppe). Darusentan ist ein selektiver ET<sub>A</sub>-R-Antagonist. Der dritten Gruppe shuntoperierter Tiere wurde mit dem Trinkwasser 0,08 mg Candesartan-Zusatz (Atacand®, Astra, Wedel, Deutschland) pro 100 ml Leitungswasser appliziert (Candesartan-Gruppe). Candesartan ist ein AT<sub>1</sub>-R-Antagonist. Die vierte Gruppe shuntoperierter Tiere erhielt Trinkwasser mit 4 mg Darusentan- und 0,08 mg Candesartan-Zusatz pro 100 ml Leitungswasser (Dualtherapie-Gruppe). Das Ziel war eine Darusentan-Applikation von 50 mg/kg Körpergewicht (KG) und eine Candesartan-Applikation von 1,0 mg/kg KG (Tabelle 2.1). Die Kalkulation der Konzentrationen der Medikamente erfolgte über Trinkmengen bei vorherigen chronischen Therapieversuchen. Die Trinkmengen wurden jeden Tag für die letzten 24 Stunden erfasst.

Gruppe	OP-Art	Medikamentenmenge	Zieldosis
Kontroll-Gruppe	Sham-OP	Kein Zusatz	Keine
Vehikel-Gruppe	Shunt-OP	1 Milliliter NaCl 0,9% / 100 ml Trinkwasser	Keine
Darusentan-Gruppe	Shunt-OP	4 mg Darusentan / 100 ml Trinkwasser	50 mg Darusentan / kg KG
Candesartan-Gruppe	Shunt-OP	0,08 mg Candesartan / 100 ml Trinkwasser	1,0 mg Candesartan / kg KG
Dualtherapie-Gruppe	Shunt-OP	4 mg Darusentan und 0,08 mg Candesartan / 100 ml Trinkwasser	50 mg Darusentan / kg KG und 1,0 mg Candesartan / kg KG

**Tabelle 2.1:** Übersicht über die durchgeführten Operationen und die Mengen und Dosierungen der Medikamente der Versuchsgruppen.

Scheinoperierte Tiere bildeten – wie unter 2.2.1 beschrieben – die Kontrollgruppe (Kontroll-Gruppe). Sie erhielten Leitungswasser ohne Zusätze als Trinkwasser ad libitum.

### 2.2.3 Hämodynamische Messungen in vivo

Zur Bestimmung der hämodynamischen Parameter wurden die Tiere durch eine intraperitoneale Gabe von Chloralhydrat (400 mg/kg KG, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) anästhesiert. Anschließend wurde zur Bestimmung des systemischen arteriellen systolischen und diastolischen Blutdrucks (BD syst. und BD diast.) ein Polyethylen-Katheter (PE-50, Außendurchmesser 0,96 mm, Innendurchmesser 0,48 mm, NeoLab, Heidelberg, Deutschland) nach Darstellung und Inzision der rechten Arteria carotis communis in das Gefäßes eingeführt. Um den linksventrikulären enddiastolischen Druck (LVEDP) zu messen, wurde dieser Katheter vorsichtig durch die Aortenklappe in den linken Ventrikel vorgeschoben.

Die Messung der Drücke erfolgte durch Konnektion der Katheter mit einem Druckaufnehmer (P23XL, Statham, Firma Viggo- Spectramed, Oxnard, Kalifornien, USA) und einem Verstärker (Pressure Processor AMP 4600, Gould, Dietzenbach, Deutschland). Die Druckkurve wurde graphisch mit einem Schreiber (TA-11, Gould, Dietzenbach, Deutschland) dargestellt. Vor jeder Messung der invasiven Blutdrücke wurde der Druckaufnehmer mit einem Quecksilber-Manometer bei 0 und 100 mmHg kalibriert.

Der zentralvenöse Druck (ZVD) wurde über einen PE-50-Katheter gemessen, der in die rechte Vena jugularis externa eingeführt und bis zur Vena cava superior vorgeschoben wurde. Die Lage wurde durch den Verlauf der Druckkurve verifiziert. Die Herzfrequenz (HF) wurde graphisch aus der Druckkurve des arteriellen Blutdruckes ermittelt. Durch Differenzierung des Drucksignals aus dem linken Ventrikel über einen Differentiator (DIF 460, Gould, Dietzenbach, Deutschland) konnte die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit ( $dP/dt$ ) als Parameter der myokardialen Kontraktilität ermittelt werden.

Für jede Gruppe wurden die hämodynamischen Parameter für 20 - 23 Tiere gemessen.

### 2.2.4 Entnahme von Blut und Organen

Nach den hämodynamischen Messungen erfolgte eine Blutentnahme von fünf ml aus der Aorta abdominalis. Das Blut wurde in vorgekühlte Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Röhrchen (Endkonzentration 7 mM, Roth

GmbH, Karlsruhe) gefüllt und sofort bei 4 °C und 2000 G zehn Minuten lang zentrifugiert (Zentrifuge EBA 12R, Hettich, Tuttlingen, Deutschland). Nach Abpipettieren des Plasmas wurde dieses sofort bei -196 °C in flüssigen Stickstoff eingefroren, bei einer Temperatur von -80°C gelagert und später wurden die ANP- und cGMP-Konzentrationen in diesen Plasma-Proben – wie unter 2.7.1 und 2.7.2 beschrieben – bestimmt.

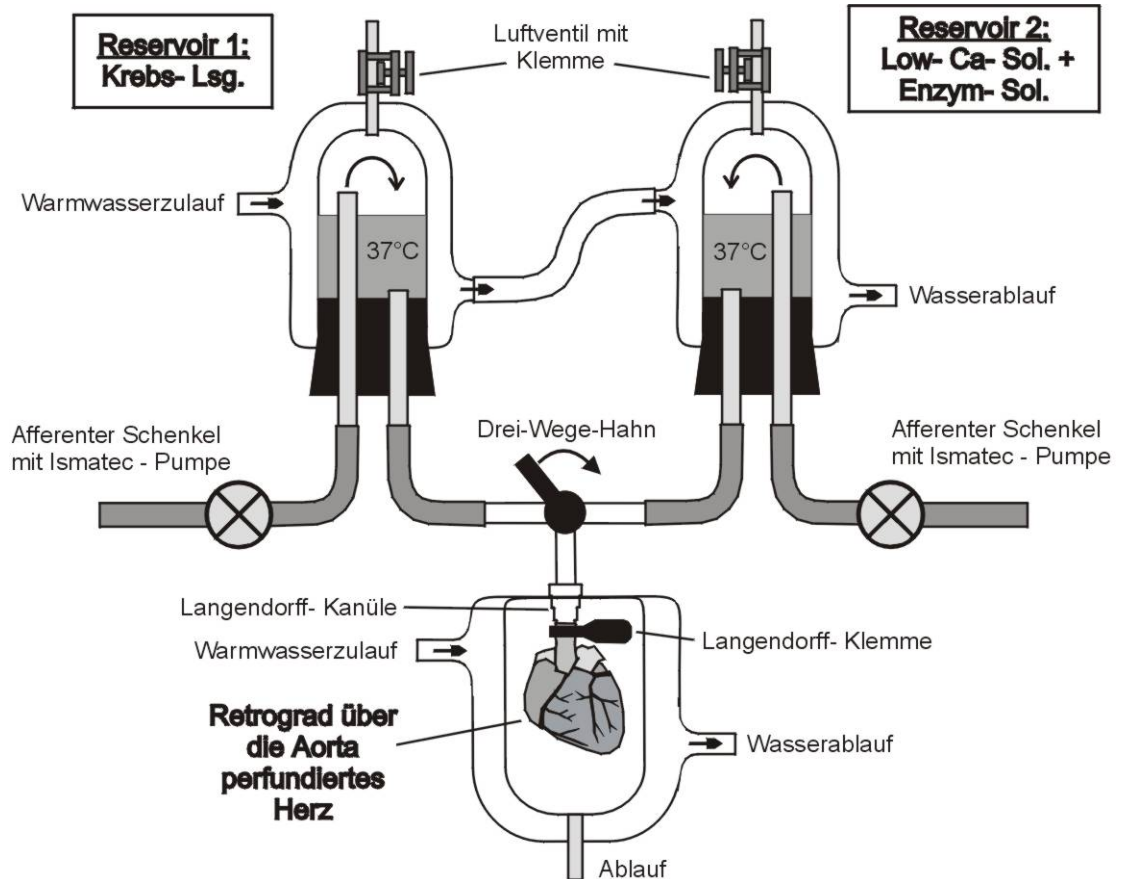
Es erfolgte nun zuerst die Entnahme des Herz-Lungen-Paketes, das sofort in eine 4°C kalte Krebs-Lösung (pH 7,4, 119,78 mM NaCl, 4,20 mM KCl, 1,92 mM MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 1,20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25,0 mM NaHCO<sub>3</sub>, 11,49 mM Glucose, 1,0 mM CaCl<sub>2</sub>, 10,0 mM HEPES) gelegt wurde. Herz und Lunge wurden anschließend getrennt und mit dem Herzen wurde wie unter 2.3.1 beschrieben fortgeföhren.

## 2.3 Isolierung der Kardiomyozyten

### 2.3.1 Präparation und Langendorff-Perfusion des Herzen

Die Präparation der isolierten Kardiomyozyten erfolgte modifiziert nach Harding et al.<sup>83-85</sup>. Das sich in der 4°C kalten Krebs-Lösung befindliche Herz wird vom Bindegewebe freipräpariert und dann unter Erhaltung des Aortenbogens vom restlichem Lungengewebe getrennt. Dieser wird dann etwa 6 mm oberhalb der Aortenklappen, knapp proximal des Abganges des Truncus brachiocephalicus abgetrennt und an der mit 37,0°C warmen Krebs-Lösung perfundierten Langendorff-Kanüle (Isolated heart canulas, Size 3, Durchmesser 2,8 mm, Hugo Sachs Elektronik, March / Freiburg, Deutschland) platziert und mittels einer Langendorff-Klemme (Isolated heart clip, Size 3, Hugo Sachs Elektronik, March / Freiburg, Deutschland) fixiert. Die Krebs-Lösung wurde ständig mit Karbogen (5 % CO<sub>2</sub>, 95 % O<sub>2</sub>) begast und hatte ebenso wie alle weiteren Perfusionslösungen aufgrund einer Erwärmung in vorgeschalteten Reservoirren (Herr Neubauer, Max-Delbrück-Zentrum, Berlin, Deutschland) eine Temperatur von 37,0°C. Die Erwärmung der Reservoirre wurde durch einen Umwälzthermostaten (Typ 001-4202, Firma Haake, Berlin) gewährleistet und die Perfusion durch eine Roller-Pumpe (Reglo Analog MS-4/6, Ismatec, Glattbrugg-Zürich, Schweiz) mit Schläuchen mit einem inneren Durchmesser von 3,50 mm (Tygon 3,50 mm I.D., Ismatec, Glattbrugg-Zürich, Schweiz).

Wenn das Herz sicher platziert und retrograd über die Aorta mit einem Fluss von 10 ml/min perfundiert war, wurde die beheizte Kammer um das Herz geschlossen (Abbildung 2.6).



**Abbildung 2.6:** Schematische Darstellung der Langendorff-Perfusion des isolierten Herzens

Das Herz sollte rhythmisch mit einer Frequenz von etwa 300 Schlägen pro Minute schlagen und das Blut herausgespült werden. Wenn dieses der Fall war, wurde für fünf Minuten mit einer O<sub>2</sub>-begasteten Low-Calcium-Lösung perfundiert (Low-Ca-Lösung, pH: 6,96, 119,99 mM NaCl, 5,39 mM KCl, 10,23 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 5,0 mM Natriumpyruvat, 20,0 mM Taurin, 20,0 mM Glucose, 80 µM CaCl<sub>2</sub>, 10,0 mM HEPES, 5,47 mM NTA) (Abbildung 2.6). Damit eine Vermischung der Krebs- und der Low-Ca-Lösung vermieden wurde, verwendeten wir einen zweiten separaten afferenten Schenkel. Die Trennung der Krebs- und der Low-Ca-Lösung war notwendig, damit dem Herzen innerhalb weniger Sekunden das extrazelluläre Kalzium entzogen werden

konnte. Dies wurde durch die unphysiologisch hohe Magnesium-Konzentration als physiologischen Gegenspieler, den erniedrigten pH-Wert, und das Nitrilotriacetic acid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) als Kalziumchelatbildner erreicht. Es folgte dann eine Perfusion für zehn Minuten mit der O<sub>2</sub>-begasten Enzym-Lösung (Enzym-Lösung, pH: 7,4, 119,99 mM NaCl, 5,39 mM KCl, 10,23 mM MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 5,0 mM Natriumpyruvat, 20,0 mM Taurin, 20,0 mM Glucose, 35 µM CaCl<sub>2</sub>, 10,0 mM HEPES mit 0,1 mg % Collagenase Typ 2, Chargennummer S6B108, Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, New Jersey, USA, 0,08 mg % Hyaluronidase Typ I-S, Lot 125H7030, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland).

### 2.3.2 Aufarbeitung des ventrikulären Gewebes

Nach erfolgter Perfusion des Herzens mit Enzym-Lösung wurde das Herz von der Langendorff-Apparatur abgenommen, die Atrien abgetrennt und mit ihnen wie unter 2.3.3 beschrieben verfahren. Die Ventrikel wurden unterhalb der Klappenebene vom Restgewebe getrennt. Das ventrikuläre Gewebe wurde dann mit Rasierklingen in kleinste Gewebeteile zerschnitten und für fünf Minuten in O<sub>2</sub>-vorbegaster Enzym-Lösung in einem beheiztem Wasserbad (Typ-1083, GFL, Burgwedel, Deutschland) bei 37°C manuell aufgeschüttelt. Danach wurde die Gewebesuspension durch eine Nylongaze (Siebgewebe, 150 µm Maschengröße, NeoLab, Heidelberg) filtriert und das sich im Filter befindliche Gewebe erneut in O<sub>2</sub>-vorbegaster Enzym-Lösung für weitere fünf Minuten aufgeschüttelt. Danach erfolgte eine erneute Filtration und das im Filter befindliche Gewebe wurde in mit O<sub>2</sub>-begaste Kraftbrühe (Kraftbrühe, pH: 7,2, 42,49 mM KCl, 15,0 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5,12 mM MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 2,50 mM Natriumpyruvat, 2,50 mM Creatine, 10,0 mM Taurin, 10,0 mM Glucose, 0,27 mM NTA, 2,50 mM β- Hydroxybutyrat, 0,1 mg % Albumin aus Rinderserum, kein Kalzium<sup>86</sup>) eingebracht und aufgeschüttelt. Es folgte alle fünf Minuten eine erneute Filtration und ein erneutes Aufschütteln des im Filter befindlichen Gewebes bis sich nur noch wenige Zellen in den Filtraten fanden. Die aus dem Gewebeverband herausgelösten Kardiomyozyten konnten den Filter passieren und sammelten sich in den Filtrationsfraktionen. In der Regel waren dazu drei bis viermalige Wiederholungen nötig. Die Filtrate der Enzym-Lösung wurden verworfen, die Filtrate der Kraftbrühe bei 200 g eine Minute

zentrifugiert (Zentrifuge EBA 12R, Hettich, Tuttlingen, Deutschland), der Überstand abpipettiert und das Pellett mit den Kardiomyozyten in Strange-Lösung (Strange-Lsg., pH: 7,4, 119,99 mM NaCl, 5,39 mM KCl, 2,0 mM MgCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O, 0,65 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O, 5,0 mM NaHCO<sub>3</sub>, 6,36 mM Natriumpyruvat, 1,0 mM CaCl<sub>2</sub>, 10,0 mM Glucose, 10,0 mM HEPES) resuspendiert.

### 2.3.3 Aufarbeitung des atrialen Gewebes

Das beidseitig abgetrennte atriale Gewebe wurde mit Rasierklingen in kleinste Gewebeteile zerteilt und in O<sub>2</sub>-vorbegaster, modifizierter Enzym-Lösung (entspricht der Enzym-Lösung (unter 2.3.1), aber mit 0,01 mg % Collagenase Typ 2 und 0,008 mg % Hyaluronidase Typ I-S) eingebracht und für fünf Minuten mit einer 1000 µl Eppendorf-Pipette (Eppendorf, Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg) aufgewirbelt. Das atriale Gewebe zeigte dabei nach Abschluss der Langendorff-Perfusion eine schwächer ausgeprägte Gewebeauflockerung als das ventrikuläre Gewebe. Danach erfolgte eine Filtration durch eine Nylongaze (Siebgewebe, 150 µm Maschengröße, NeoLab, Heidelberg) und das sich im Filter befindliche Gewebe wurde erneut für fünf Minuten in modifizierte Enzym-Lösung eingebracht und mittels der Eppendorf-Pipette aufgewirbelt. Nach erneuter Filtration wurde das im Filter befindliche Gewebe in modifizierte Strange-Lösung (entspricht der Strange-Lösung , aber mit 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>) eingebracht, mittels der Eppendorf-Pipette aufgewirbelt und filtriert bis in den Filtraten nur wenige Zellen zu finden waren. Die Filtrate wurde alle bei 200 g zwei Minuten zentrifugiert und nach Abpipettieren des Überstandes wurde das Pellett in modifizierter Strange-Lösung resuspendiert <sup>84</sup>,  
<sup>85</sup>.

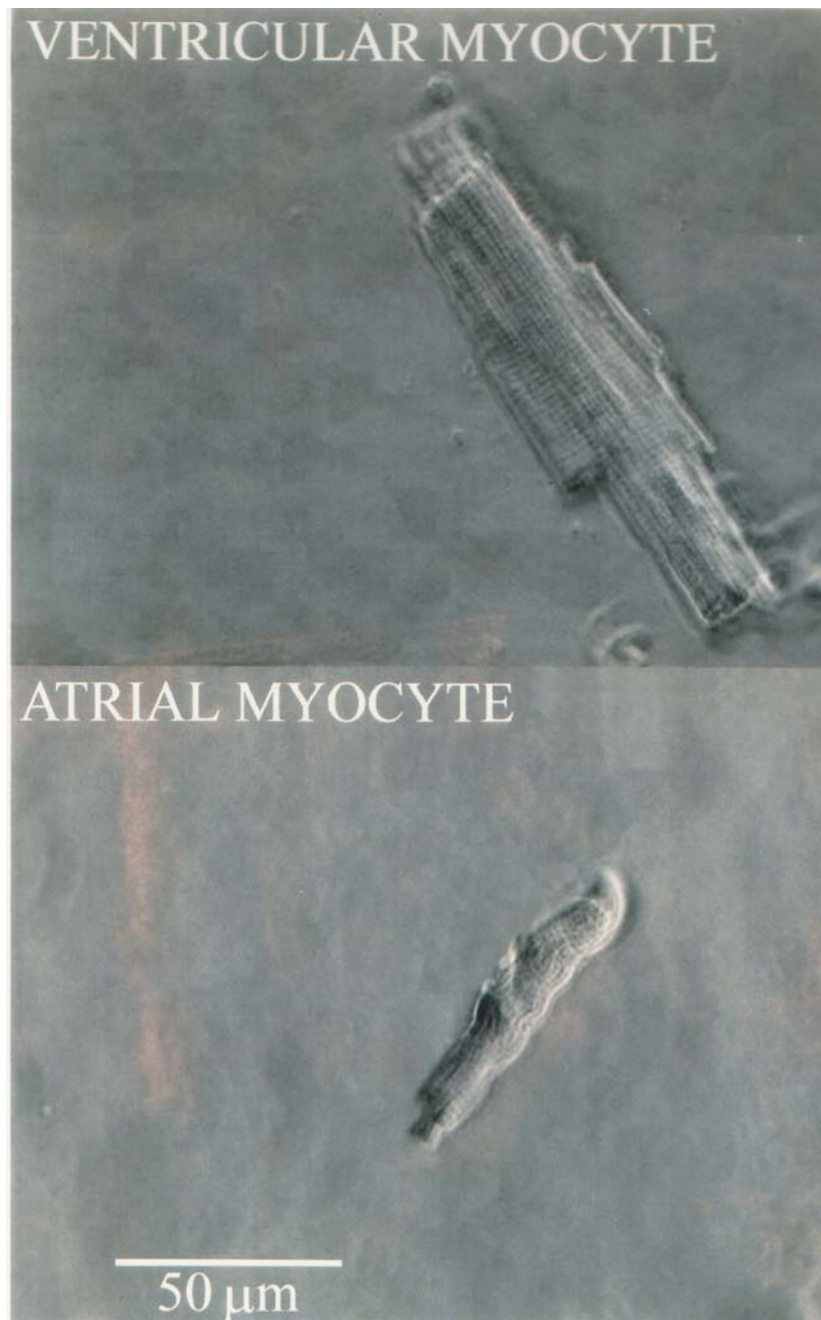
### 2.3.4 Zählung der Kardiomyozyten in Suspension

Nach erfolgter Isolation der Kardiomyozyten wurden die verschiedenen Fraktionen der Isolation gepoolt und in eine Neubauer-Zähl-Kammer (MAGV, Rabenau-Londorf, Deutschland) eingebracht. Dabei wurde durch Auszählung die Zellzahl an lebenden und toten Zellen pro ml Zellsuspension ermittelt. Die Zellen wurden als lebensfähig bezeichnet, wenn sie sich in Strange-Lösung stäbchenförmig mit deutlicher Querstreifung, scharfen Kanten und ohne



Anzeichen einer Granulationsbildung, einer beginnenden Abrundung oder einer Hyperkontraktion der Zellen zeigten. Dieses erfolgte für die Zellsuspension der atrialen und der ventrikulären Zellen (Abbildung 2.7).

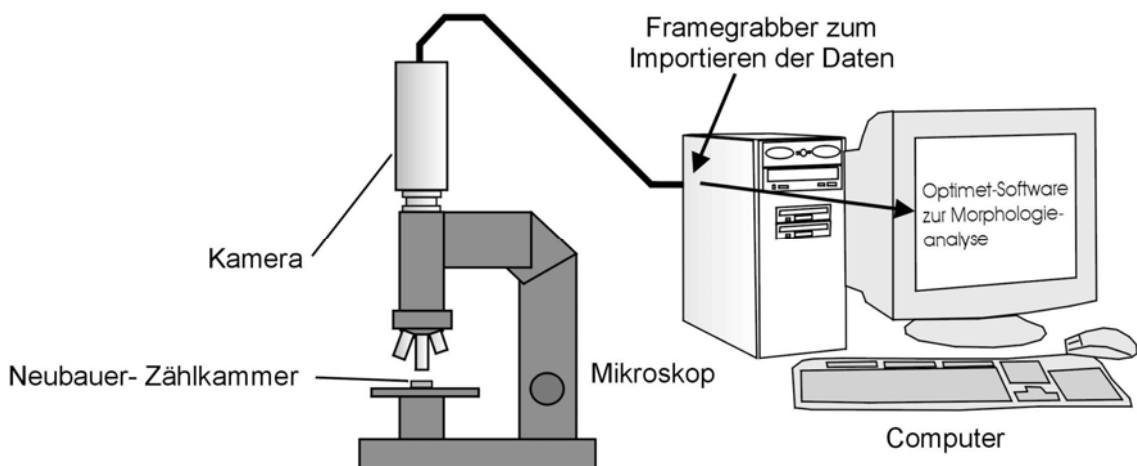
Dabei fanden sich Quoten an lebenden Zellen in der ventrikulären Zellsuspension über 60 % und in der atrialen Zellsuspension zwischen 15 bis 25 % bei wenig Varianz in den Quoten zwischen verschiedenen Isolationen.



**Abbildung 2.7:** Photographien isolierter ventrikulärer und atrialer Kardiomyozyten.

## 2.4 Erfassung der Morphologie der isolierten atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten

Nach ausführlicher Resuspension der gepoolten Zellsuspensionen wurde ein Tropfen auf einem Neubauer-Objektträger aufgebracht und die Felder der Kammer in vorher festgelegter Weise von links oben nach rechts unten nach Zellen durchgegangen, die über ein inverses Mikroskop (Wilovert S, Firma Hund, Wetzlar, Deutschland) mit einer Kamera (Color Video Camera TK-1281, JVC Deutschland GmbH, Friedberg, Deutschland) und einem Framegrabber (Firma Stemmer, Puchheim, Deutschland) in einen Computer eingelesen wurden und dann mit der Analysesoftware Optimetric II (Firma Stemmer, Puchheim, Deutschland) ausgemessen wurden (Abbildung 2.8).



**Abbildung 2.8:** Darstellung der Kontraktionskammer zur Kontraktionsmessung.

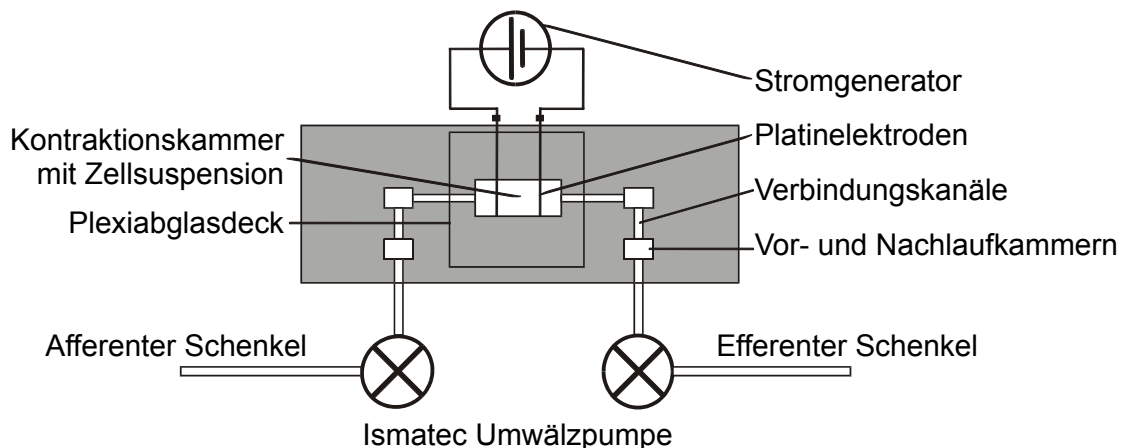
Dieser Vorgang wurde sowohl für die atrialen als auch die ventrikulären Zellsuspensionen durchgeführt. Es wurden Zellen von 11 - 12 Tieren pro Gruppe erfasst.

Die Bilder von 25 Zellen für jedes Tier wurden erfasst. Es wurden nur lebende Zellen mit intakter Längs- und Querstreifung, ohne Verformungen und Überlagerungen anderer Zellen ausgewählt. Die Zellbreite, -länge und -fläche der Zellen wurden dann mittels Software ausgemessen und das Zellvolumen über die Formel bestimmt:

$$\text{Zellvolumen} = \pi \times \text{Zellfläche} \times \text{Zellbreite} / 4$$

## 2.5 Messung der Kontraktilität der isolierten Kardiomyozyten

Die Messung der Kontraktionsantwort der Zellen auf elektrische Stimuli erfolgte in einer speziell angefertigten, superfundierten Kontraktionskammer (Herr Neubauer, Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin, Berlin, Deutschland) (Abbildung 2.9). Es wurde die Beeinflussung der Kontraktionsantwort durch Isoprenalin-Zusatz und erhöhten extrazellulären Kalzium-Konzentrationen untersucht.



**Abbildung 2.9:** Darstellung der Kontraktionskammer zur Kontraktionsmessung.

Nach ausführlicher Resuspension zur Vermeidung einer Selektion wurden die Zellen in die Kontraktionskammer eingebracht. Dabei waren sowohl der afferente als auch efferente Schenkel der Apparatur mit erwärmter Strange-Lösung gefüllt. Nach einer Minute, um den Zellen Zeit zu geben sich abzusetzen, wurde die Superperfusion der Kontraktionskammer mit der auf 32 °C erwärmten Strange-Lösung begonnen und sie mit einem Plexiglasobjektträger verschlossen. Eventuelle Unregelmäßigkeiten des Flusses durch die Roller-Pumpe (Reglo Analog MS-4/6, Ismatec, Glattbrugg-Zürich, Schweiz) mit Schläuchen mit einem inneren Durchmesser von 0,51 mm (Tygon 0,51 mm I.D., Ismatec, Glattbrugg-Zürich, Schweiz) wurde durch die Vor- und Nachlaufkammern ausgeglichen, damit die Zellen sich nicht durch Flussunregelmäßigkeiten bewegten. Die elektrische Stimulation erfolgte über die in der Kontraktionskammer platzierten Platindrähte durch einen Strom-Generator (Stimulator P, Typ 201, Hugo Sachs Elektronik, March / Freiburg, Deutschland) (faradayscher, repetitiver, monophasischer Impuls, Frequenz 1/3

Hertz). Das Volumen der Kontraktionskammer wurde innerhalb von zwei Minuten und 20 Sekunden komplett umgesetzt. Die Zeit von der Applikation eines Stoffes über den afferenten Schenkel bis zu dessen vollständiger Wirkung an den in der Kontraktionskammer superfundierten Kardiomyozyten betrug etwa drei Minuten.

Perfusionsphase	Perfusionslösung	Perfusionsdauer
Äquilibrierungsphase	Strange-Lösung mit 1 mmol/l	20 Min.
Isoprenalin-Anstieg	Strange-Lösung plus 5 nmol/l Isoprenalin	6 Min.
	Strange-Lösung plus 10 nmol/l Isoprenalin	6 Min.
	Strange-Lösung plus 50 nmol/l Isoprenalin	6 Min.
Auswaschphase	Strange-Lösung mit 1 mmol/l Kalzium	10 Min.
Kalziumanstieg	Strange-Lösung mit 2 mmol/l Kalzium	5 Min.
	Strange-Lösung mit 4 mmol/l Kalzium	5 Min.
	Strange-Lösung mit 6 mmol/l Kalzium	5 Min.
	Strange-Lösung mit 8 mmol/l Kalzium	5 Min.

**Tabelle 2.2:** Zeitlicher Ablauf der Superperfusion der isolierten Kardiomyozyten.

Nach einer Äquilibrierungsphase von 20 Minuten mit Superfusion mit Strange-Lösung als Baseline wurde eine Superfusion mit Strange-Lösung mit Zusatz von 5 nmol/l, 10 nmol/l und 50 nmol/l Isoprenalin für je 6 Minuten durchgeführt. Nach einer Superperfusion mit Strange-Lösung ohne weitere Zusätze erreichten die Zellen innerhalb von sechs bis acht Minuten erneut Baselineaktivität. Anschließend erfolgte alle fünf Minuten eine stufenweise Erhöhung der Kalziumkonzentration der Strange-Lösung von 1 mmol/l auf 2 mmol/l, 4 mmol/l, 6 mmol/l und 8 mmol/l (Tabelle 2.2).

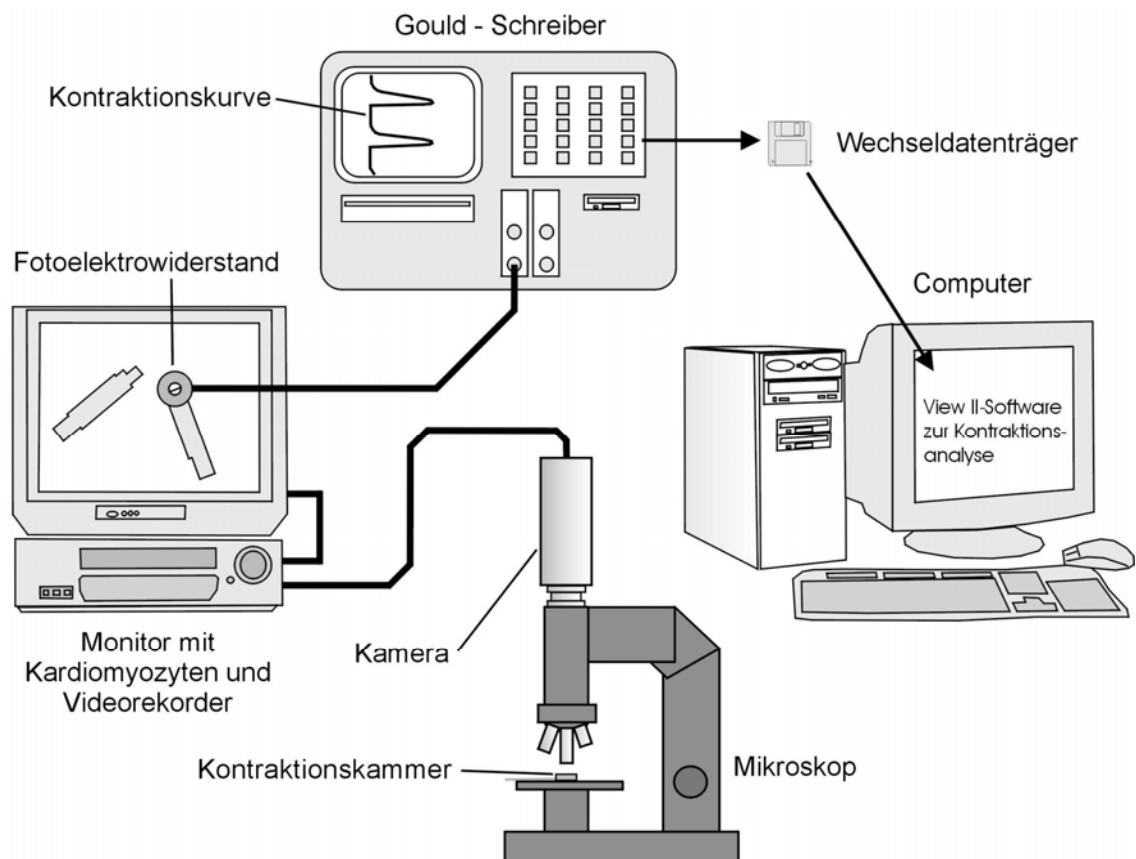
Die Kontraktionskammer befand sich unter einem inversen Mikroskop (Wilovert S, Firma Hund, Wetzlar, Deutschland) mit einer Kamera (Color Video Camera TK-1281, JVC Deutschland GmbH, Friedberg, Deutschland), deren Signal über einen Videorekorder (RTV-915 HIFI, Blaupunkt, Hildesheim, Deutschland) auf einen Fernseher (Monolith 100 IDTV digital, Grundig, Nürnberg, Deutschland) übertragen wurde. Von jeder Zelle wurden zwei Minuten der Baselineaktivität, der Aktivitäten unter den jeweiligen Isoprenalinkonzentrationen auf Videokassetten (TDK SE-240 XP Super VHS, TDK Regional Office, Leonberg/Stuttgart, Deutschland) aufgenommen (Abbildung 2.10). Vom Ende der Auswaschphase bis zum Ende des Kontraktionsmessprotokolls erfolgte eine kontinuierliche Aufzeichnung. Des weiteren erfolgte während des ganzen Versuchsablaufs eine Online-Messung der Zellkontraktionen zur Kontrolle des Versuchsablaufs.

Es wurden nur Zellen in die Kontraktionsauswertung eingeschlossen, die während des ganzen Versuchsablaufs keine arrhythmischen Aktivitäten zeigten, keine morphologischen Schäden aufwiesen und in der Auswaschphase eine Kontraktionsantwort auf Baselineniveau erreichten.

Die Zelllänge wurden bei einer Vergrößerung um den Faktor 1380 in Einzelbildvorschub einmal kurz vor Beginn einer Kontraktion und einmal bei maximaler Kontraktion ausgemessen, um die Kontraktionsamplitude zu erfassen. Dieses erfolgte für jede Zelle für vier Kontraktionszyklen an sechs Messpunkten. Am Ende der Äquilibrationsphase erfolgte zunächst die Messung der Baselinekontraktionen (Baseline). Dann erfolgten die Messungen für die drei Isoprenalinkonzentrationen (Iso 5nM, Iso 10 nM, Iso 50 nM) und am Ende der Auswaschphase. Schließlich wurde die maximale Kontraktionsantwort im Verlauf des Anstieges der Kalziumkonzentration gemessen (Max. Ca.), bei der die Zelle nicht Zeichen von Arrhythmogenität oder Zeichen von Zellschäden wie z.B. intrazelluläre Blasenbildung zeigte.

Ein Photoelektrowiderstand (Herr Strämel, Franz-Volhard-Klinik, Berlin, Deutschland) erzeugt durch die Kontraktion entstehende Helligkeitsänderungen der dunkleren Zelle zum helleren Hintergrund ein elektrisches Signal. Von jeder Zelle wurde nun – den Messpunkten entsprechend – mit Hilfe des Photoelektrowiderstands, dessen Signal einem Schreiber (WindowGraf 980, Gould, Dietzenbach, Deutschland) zugeleitet wurde, eine Kontraktionskurve

geschrieben. Aus der Kontraktionskurve wurde mit der View-II-Software (Version 1.21, Gould Inc., Recording Systems Division, Cleveland, Ohio, USA) die Kontraktionsamplitude und aus deren ersten Ableitung über die Zeit die Anspannungs- und Entspannungsgeschwindigkeit ermittelt. Dabei wurde die Amplitude der Kontraktionskurve an den Werten der entsprechenden Messungen der Zelllänge bei Einzelbildvorschub ausgerichtet <sup>87</sup> (Abbildung 2.10).



**Abbildung 2.10:** Darstellung des Versuchsaufbaus zur Kontraktionsmessung und der Messung der Morphologie isolierter Kardiomyozyten.

Die Kontraktionsparameter wurden für jede der fünf Gruppen an jedem der sechs Messzeitpunkte an drei bis fünf Zellen von acht bis neun Tieren pro Gruppe erfasst.

## 2.6 Bestimmung von ANP und cGMP im Plasma

Aus den EDTA-Plasma-Proben von 20 - 23 Tieren pro Versuchsgruppe – wie unter 2.2.4 beschrieben – erfolgte die Extraktion des C-terminalen ANP

mittels C18-Sep Pak Säulen (Waters, Eschborn, Deutschland), die zuvor mit Azetonitril (Merck, Darmstadt, Deutschland) und Ammoniumazetat (0,2 %, pH: 4,0, Merck, Darmstadt, Deutschland) aktiviert worden waren. Aufgrund einer raschen Zentrifugation und Pipettierfolge und konsequenter, ununterbrochener Kühlung war, wie in Vorversuchen gezeigt wurde, eine zusätzliche Addition von Peptidaseinhibitoren zur Hemmung des enzymatischen Abbaus des ANP nicht notwendig. Nach Zugabe des Plasmas wurden die Säulen mit 40-prozentiger Ammoniumazetat-Lösung gewaschen, und ANP wurde mit einer Lösung aus 60% Azetonitril und 40% Ammoniumazetat eluiert. Diese extrahierten Proben wurden dann in einem Radioimmunoassay (RIA, 1470 Wizard Automatic Gamma Counter, Wallac-ADL-GmbH, Freiburg) mit Antikörpern gemessen, die uns freundlicherweise von Dr. J. Gutkowska, Montreal, Kanada, zur Verfügung gestellt wurden<sup>88</sup>. Die Intraassayvariabilität betrug weniger als 5 % und die Interassayvariabilität war unter 10 %. Die Etablierung der Methode erfolgte in Rahmen einer wissenschaftlichen Kooperation mit Dr. G. Thibault, Montreal, Kanada.

Die Bestimmung des second messengers cGMP im Plasma erfolgte nach Enteiweißung der Proben durch Hinzufügen von 1N Perchloroessigsäure (Sigma, St. Louis, USA) und anschließender Zentrifugation über 10 Minuten bei 2000 G und 4°C (Eppendorf-Zentrifuge, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Der Überstand wurde abpipettiert und in einem sich anschließenden Schritt extrahiert. Dazu wurde der klare Überstand auf Aluminum-Säulen (AG7, Bio-Rad Laboratories, Richmond, Kalifornien, USA) gegeben und das gebundene cGMP mit 4 ml Ammoniumformat (0,3 M, Serva, Heidelberg, Deutschland) auf Dowex-Säulen (50W X8, Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA) eluiert. Nach Spülen der Säulen mit 1 ml H<sub>2</sub>O wurde das cGMP mit 4 ml H<sub>2</sub>O ausgewaschen. Die hierbei erreichte Extraktionskoeffizienz betrug etwa 30 - 35 %. Das eluierte cGMP konnte dann in den Radioimmunoassay eingesetzt werden, wobei die spezifischen Antikörper für diesen RIA freundlicherweise von Dr. P. Hamet, Montreal, Kanada, zur Verfügung gestellt wurden<sup>89</sup>.

## 2.7 Statistische Auswertung und graphische Darstellung

Alle erhobenen Daten wurden mit Hilfe einer Varianzanalyse (ANOVA, Analyses of Variance) mit dem Programm StatView II (SAS, Cary, North

Carolina 27513, USA) statistisch ausgewertet. Nach Eignung wurden als post-hoc-Test der Student T-Test verwendet. Eine statistische Signifikanz wurde bei  $p < 0,05$  erreicht. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM).



### 3 Versuchsergebnisse

#### 3.1 Versuchsverlaufsdaten

##### 3.1.1 Überlebensdaten

Die Mortalität nach dem zweiten postoperativen Tag war bei vehikelbehandelten Shunttieren mit 28 % höher im Verhältnis zu 0 % bei Kontrolltieren. In allen Therapiegruppen war die postoperative Mortalität niedriger als in der Vehikel-Gruppe und lag in der Darusentan-Gruppe bei 4 %, in der Candesartan-Gruppe bei 10 % und in der Dualtherapie-Gruppe bei 11 %.

Die n-Zahlen waren für die Kontroll-Gruppe n=27, die Vehikel-Gruppe n=32, die Darusentan-Gruppe n=31, die Candesartan-Gruppe n=30 und für die Dualtherapie-Gruppe n=32. Die Ergebnisse waren aufgrund der geringen Tierzahlen und des kurzen Beobachtungszeitraums nicht statistisch signifikant (Diagramm 3.1).

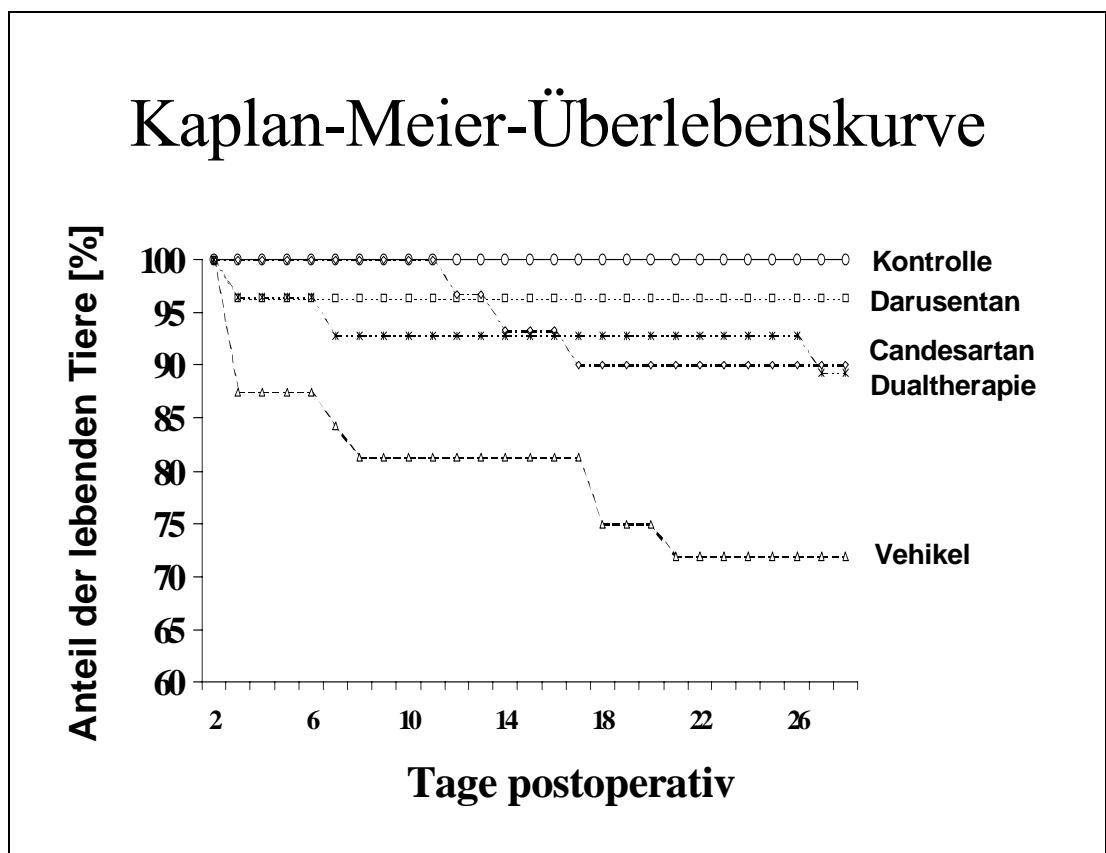
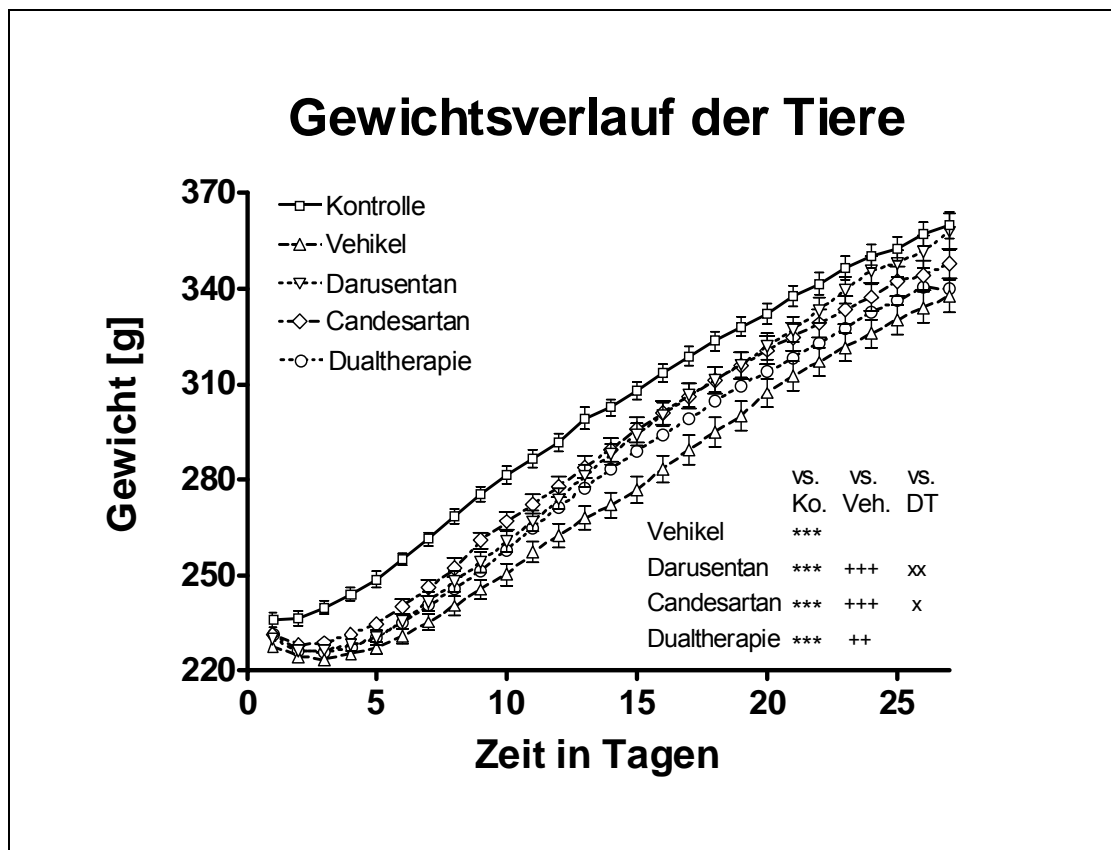


Diagramm 3.1: Kaplan-Meier-Überlebenskurve für den zweiten bis 28. postoperativen Tag für Kontroll- und therapierte Shunttiere.

Die mit Darusentan behandelten Tiere verstarben nur initial bis zum vierten postoperativen Tag. In den anderen Gruppen shuntoperierter Tiere hingegen verstarben Tiere auch noch in der zweiten Hälfte des Beobachtungszeitraumes.

### 3.1.2 Tiergewichte

Der Gewichtsverlauf über den Versuchszeitraum zeichnete sich in allen Gruppen durch ein stetiges Wachstum aus. Shuntoperierte Tiere verloren zwar in den ersten vier Tagen nach Shuntanlage an Gewicht, zeigten dann aber ebenso eine stetige Gewichtszunahme.



**Diagramm 3.2:** Gewichtsverlauf der Kontroll- und therapierten Shunttiere.

\*\*\* =  $p < 0,001$  (vs. Kontrolle, K.); ++ =  $p < 0,01$  (vs. Vehikel, Veh.); +++ =  $p < 0,001$  (vs. Vehikel, Veh.); x =  $p < 0,05$  (vs. Dualtherapie, DT.); xx =  $p < 0,01$  (vs. Dualtherapie, DT.).

Kontrolltiere wiesen im Vergleich zu shuntoperierten Tieren unabhängig von der Therapie höhere Körpergewichte auf. Vehikelbehandelte Shunttiere

hatten niedrigere Körpergewichte im Vergleich zu allen anderen Therapie-Gruppen. Zusätzlich besaßen die Tiere der Darusentan- und Candesartan-Gruppe ein höheres Körpergewicht verglichen mit denen der Dualtherapie-Gruppe. Alle statistischen Angaben beziehen sich auf den Gesamtverlauf der Kurven (Diagramm 3.2).

### 3.1.3 Medikamentendosierungen

Als Applikationsform konnte bei oraler Verfügbarkeit von Darusentan und Candesartan die Bereitstellung der Medikamente mit dem Trinkwasser gewählt werden<sup>90-92</sup>. Dies ermöglichte eine ökonomische und sichere Durchführbarkeit.

Die Dosierungen der applizierten Medikamente wurden durch die tägliche Menge an Trinkwasser bezogen auf das aktuelle Körpergewicht der Tiere erfasst. Dabei erhielten die Tiere der Darusentan-Gruppe  $47,0 \pm 0,3$  mg Darusentan, die der Candesartan-Gruppe  $0,91 \pm 0,007$  mg Candesartan und die Dualtherapie-Gruppe  $48,8 \pm 0,4$  mg Darusentan und  $0,98 \pm 0,007$  mg Candesartan pro Kilogramm Körpergewicht und Tag. In Vorversuchen wurden die für die Zieldosis notwendigen Konzentrationen der Medikamente pro Liter Trinkwasser bestimmt. Die orale Applikation der Medikamente wurde durch die Tiere gut toleriert.

## 3.2 Herzkreislauf-Parameter

### 3.2.1 Häodynamische Parameter

Vehikelbehandelte Shunttiere zeigten im Vergleich zu Kontrolltieren einen erniedrigten systolischen, diastolischen und mittleren Blutdruck (BP syst., BP diast., MAP, siehe Tabelle 3.1), einen von  $2,0 \pm 0,3$  auf  $7,1 \pm 0,7$  mmHg erhöhten zentralvenösen Druck (ZVD, siehe Diagramm 3.3) und einen von  $8,2 \pm 0,8$  auf  $20,1 \pm 1,3$  mmHg erhöhten linksventrikulären, enddiastolischen Druck (LVEDP, siehe Diagramm 3.4). Die maximale ventrikuläre Druckerhöhungsgeschwindigkeit (dp/dt) verminderte sich in der Vehikel-Gruppe von  $3985 \pm 131$  auf  $2783 \pm 133$  mmHg/s (siehe Diagramm 3.5). All diese Unterschiede zwischen Kontroll- und vehikelbehandelten Shunttieren waren signifikant. Unverändert zeigte sich hingegen die Herzfrequenz.

Auf die Blutdruckwerte und die Herzfrequenz shuntoperierter Tiere hatten die Therapien keinen Einfluss (siehe Tabelle 3.1). In der hier vorgelegten Arbeit wurde die Dosis des Darusentans oder des Candesartans so gewählt, dass keine signifikanten Veränderungen der hämodynamischen Parameter resultierten.

Parameter	Kontrolle	Vehikel	Darusentan	Candesartan	Dualtherapie
<b>BP syst. (mmHg)</b>	104±1,9	90,6±1,9***	91,9±2,4***	86,1±3,2***	93,9±1,7***
<b>BP diast. (mmHg)</b>	79,6±2,2	61,8±2,2***	62,3±2,8***	57,1±3,5***	63,1±2,4***
<b>MAP (mmHg)</b>	88,3±2,0	72,0±2,0***	72,0±2,5***	66,5±3,2***	73,4±2,1***
<b>HF (Hz)</b>	445±6,4	440±17	420±16	430±10	443±6,1

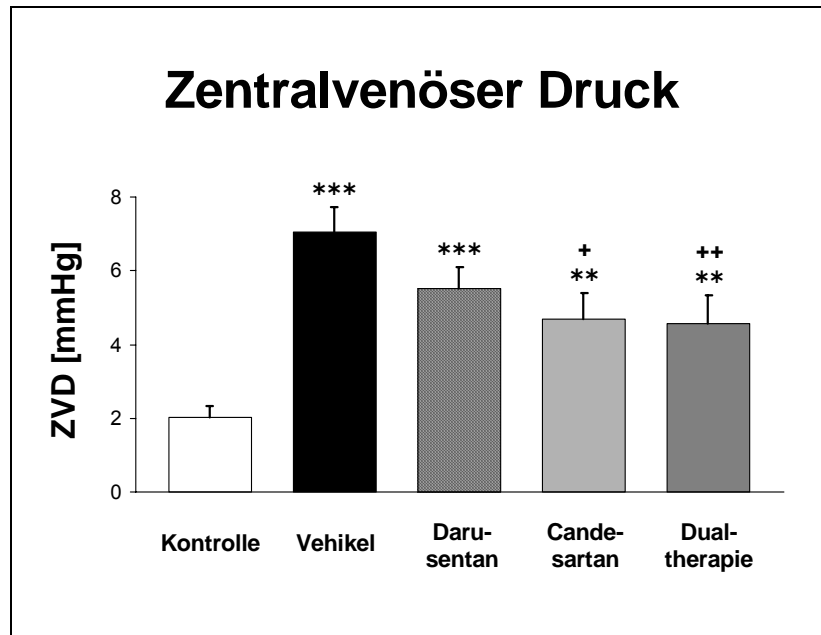
**Tabelle 3.1:** Hämodynamische Parameter der Kontroll- und der therapierten Shunttiere.

\*\*\* =  $p < 0,001$  (vs. Kontrolle).

Bei einer Therapie mit Candesartan und Dualtherapie kam es zu einer signifikanten Senkung des ZVD im Vergleich zur Vehikel-Gruppe (Diagramm 3.3).

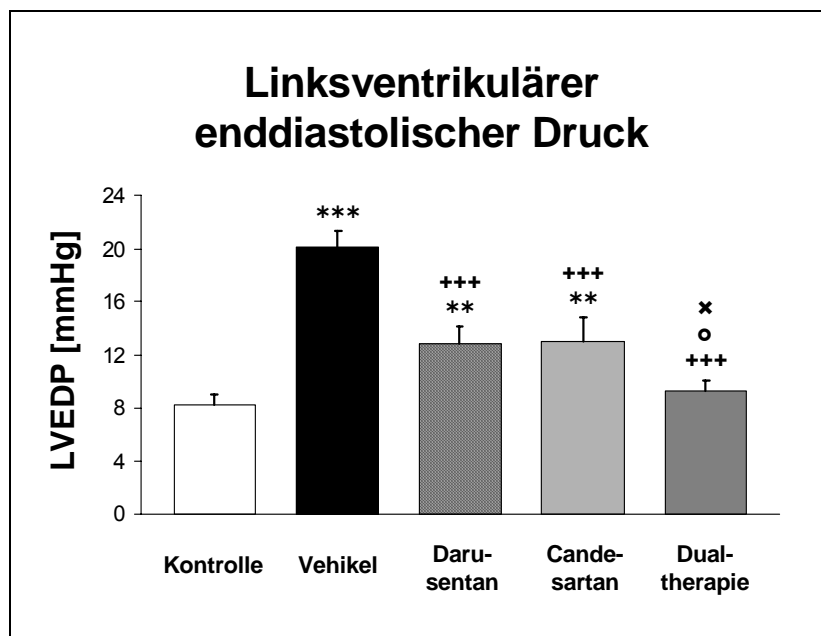
Alle drei Therapieformen waren in der Lage den LVEDP im Vergleich zur Vehikel-Gruppe hochsignifikant zu senken. Dabei zeigten die Monotherapien vergleichbare Effekte und senkten den LVEDP von  $20,1 \pm 1,3$  in der Vehikel-Gruppe auf  $12,8 \pm 1,3$  mmHg in der Darusentan- und  $13,0 \pm 1,8$  mmHg in der Candesartan-Gruppe. In der Dualtherapie-Gruppe fand sich hingegen der LVEDP mit  $9,2 \pm 0,8$  mmHg normalisiert zur Kontroll-Gruppe und war ebenfalls signifikant reduziert im Vergleich zu beiden Monotherapien (Diagramm 3.4).

Die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit ( $dP/dt \text{ max.}$ ) als Parameter für die myokardiale Kontraktilität in vivo war in der Vehikel-Gruppe hochsignifikant niedriger im Vergleich zur Kontroll-Gruppe. Die Therapie mit Darusentan und Dualtherapie führte zu einer signifikanten Erhöhung des  $dP/dt$  im Vergleich zur Vehikel-Therapie (Diagramm 3.5).



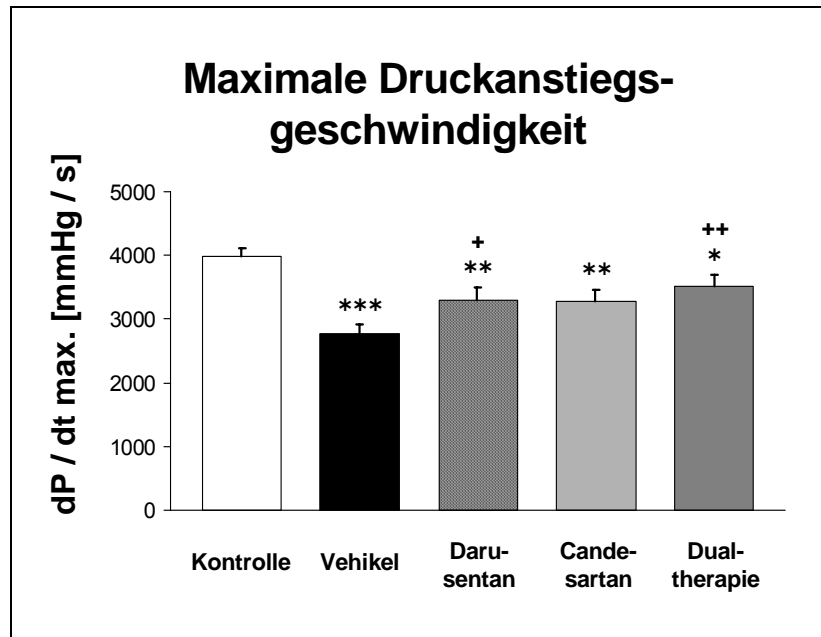
**Diagramm 3.3:** Der zentralvenöser Druck (ZVD) der Kontroll- und der therapierten Shunttiere.

\*\* =  $p < 0,01$  (vs. Kontrolle); \*\*\* =  $p < 0,001$  (vs. Kontrolle); + =  $p < 0,05$  (vs. Vehikel); ++ =  $p < 0,01$  (vs. Vehikel).



**Diagramm 3.4:** Linksventrikulärer enddiastolischer Druck der Kontroll- und der therapierten Shunttiere.

\*\* =  $p < 0,01$  (vs. Kontrolle); \*\*\* =  $p < 0,001$  (vs. Kontrolle); +++ =  $p < 0,001$  (vs. Vehikel); o =  $p < 0,05$  (vs. Darusentan); x =  $p < 0,05$  (vs. Candesartan).



**Diagramm 3.5:** Maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt max.) der Kontroll- und der therapierten Shunttiere.

\* =  $p < 0,05$  (vs. Kontrolle); \*\* =  $p < 0,01$  (vs. Kontrolle); \*\*\* =  $p < 0,001$  (vs. Kontrolle); + =  $p < 0,05$  (vs. Vehikel); ++ =  $p < 0,01$  (vs. Vehikel).

### 3.2.2 Organgewichte

Bei vehikelbehandelten Shunttieren entwickelte sich 28 Tagen nach Shuntinduktion eine Zunahme des Herzgewichtes um etwa 90 % im Vergleich zu den Kontrolltieren.

Parameter	Kontrolle	Vehikel	Darusentan	Candesartan	Dualtherapie
<b>Absolutes Herzgewicht (g)</b>	1,36±0,04	2,58±0,08***	2,59±0,08***	2,34±0,07*** +	2,40±0,08***
<b>Relatives Herzgewicht (g/kg KG)</b>	0,37±0,01	0,77±0,02***	0,69±0,02*** +	0,67±0,03*** +	0,67±0,02*** ++

**Tabelle 3.2:** Das absolute und zum Körpergewicht relativierte Herzgewicht der Kontroll- und der therapierten Shunttiere.

\*\*\* =  $p < 0,001$  (vs. Kontrolle); + =  $p < 0,05$  (vs. Vehikel); ++ =  $p < 0,01$  (vs. Vehikel).

Alle drei Therapieformen waren in der Lage antihypertrophe Effekte mit Reduktion des relativen Herzgewichtes nachzuweisen. Eine Reduktion des absoluten Herzgewichtes im Vergleich zur mit Vehikel behandelten Gruppe zeigten nur mit Candesartan behandelte Shunttiere (Tabelle 3.2).

### 3.2.3 Natriuretische Peptide

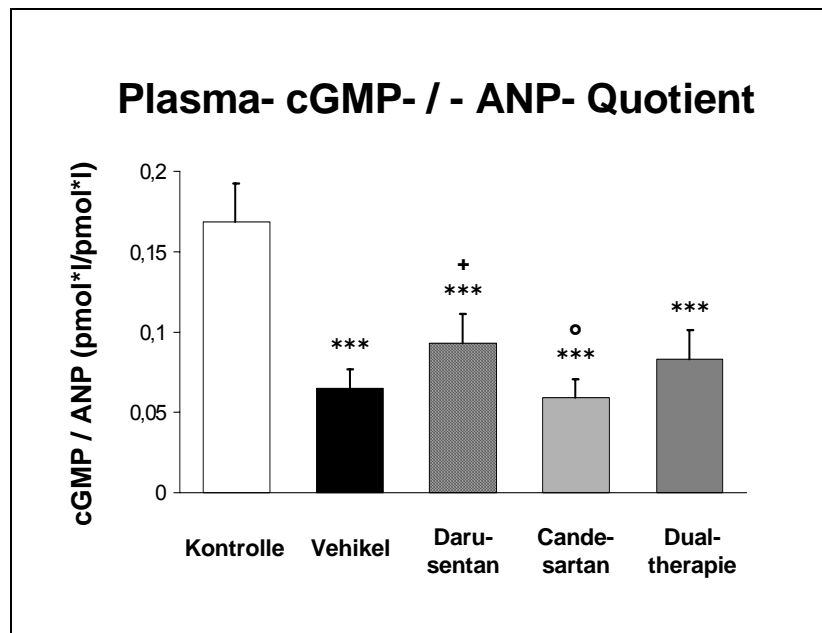
Die ANP- und cGMP-Plasmakonzentrationen waren bei den vehikelbehandelten Shunttieren hochsignifikant erhöht im Vergleich zu denen der Kontrolltiere. Alle drei Therapieformen hatten keinen Einfluss auf die ANP-Plasma-Werte. Nur mit Darusentan behandelte Shunttiere wiesen im Vergleich zu vehikelbehandelten Shunttieren eine höhere cGMP-Plasmakonzentration auf (Tabelle 3.3).

Parameter	Kontrolle	Vehikel	Daru- sentan	Cande- sartan	Dual- therapie
Plasma- ANP (pmol/l)	285±57	1700±235***	2113±285***	2289±323***	2245±347***
Plasma cGMP (pmol/l)	43±7,2	85±10,3***	119±9,8*** +	88±9,7*** ◦	104±8,3***

**Tabelle 3.3:** Die ANP- und cGMP-Plasmakonzentrationen der Kontroll- und der therapierten Shunttiere.

\*\*\* = p<0,001 (vs. Kontrolle); + = p<0,05 (vs. Vehikel); ◦ = p<0,05 (vs. Darusentan).

Der Quotient aus den Plasmakonzentrationen von cGMP zu ANP zeigte sich bei vehikelbehandelten Shunttieren hochsignifikant erniedrigt im Vergleich zu Kontrolltieren. Die Quotienten der therapierten Shunttiere waren auch hochsignifikant erniedrigt im Vergleich zu den Kontrolltieren. Nur mit Darusentan behandelte Tiere wiesen einen zur Vehikel-Gruppe erhöhten Quotienten auf (Diagramm 3.6).



**Diagramm 3.6:** Der Quotient der cGMP- und der ANP-Plasmakonzentrationen der Kontroll- und der therapierten Shunttiere.

\*\*\* =  $p < 0,001$  (vs. Kontrolle); + =  $p < 0,05$  (vs. Vehikel); ° =  $p < 0,05$  (vs. Darusentan).

### 3.3 Zelluläre Parameter

#### 3.3.1 Morphologie ventrikulärer Zellen

Die Morphologie der ventrikulären Kardiomyozyten zeigte eine hochsignifikante Zunahme der Zelllänge der vehikelbehandelten Shunttiere ( $165 \pm 6,2 \mu\text{m}$ ) im Vergleich zur Zelllänge der Kontrolltiere ( $123 \pm 2,1 \mu\text{m}$ ).

Die Zellen der Therapiegruppen waren länger im Vergleich zu Zellen der Kontrolltiere. Zwischen den Zelllängen der Darusentan-, Candesartan- und der Vehikel-Gruppe fand sich kein Unterschied. Die Dualtherapie hingegen war in der Lage die Zelllänge auf  $143 \pm 4,8 \mu\text{m}$  im Vergleich zu Zellen der Vehikel-Gruppe ( $165 \pm 6,2 \mu\text{m}$ ) und der Darusentan-Gruppe ( $158 \pm 4,7 \mu\text{m}$ ) signifikant zu reduzieren ([Diagramm 3.7](#)).

Die Zellbreite der vehikelbehandelten Shunttiere fand sich von  $30,1 \pm 0,9 \mu\text{m}$  auf  $41,0 \pm 1,0 \mu\text{m}$  hochsignifikant erhöht im Vergleich zur Zellbreite der Kontrolltiere.

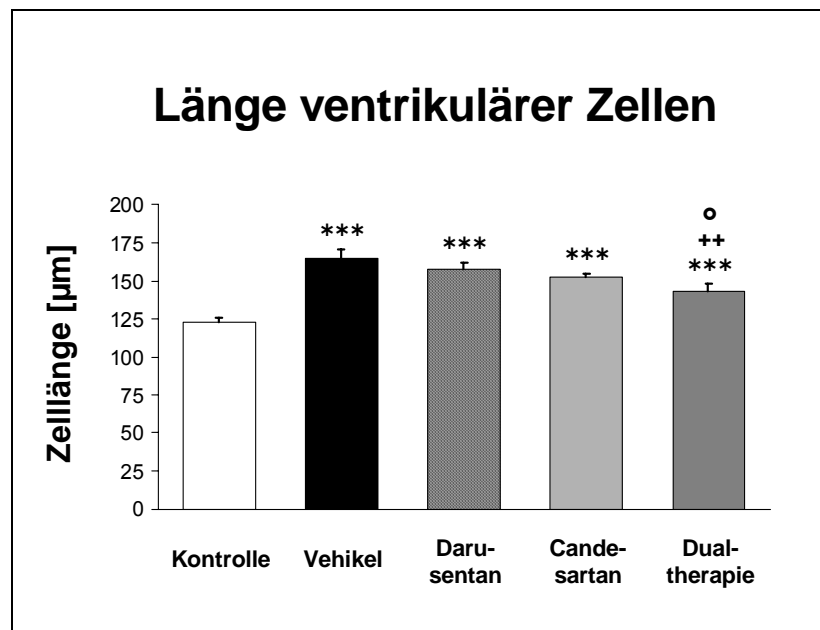
Alle drei Therapien waren in der Lage die Breite der Zellen im Vergleich zu vehikelbehandelten Shunttiere hochsignifikant zu senken. Die Therapie mit



Darusentan senkte die Zellbreite auf  $30,9 \pm 0,7 \mu\text{m}$ , das war signifikant schmäler als bei den Zellen der Candesartan- und der Dualtherapie-Gruppe. Zwischen der Breite der Zellen der Candesartan- und der Dualtherapie-Gruppe fand sich kein Unterschied (Diagramm 3.8).

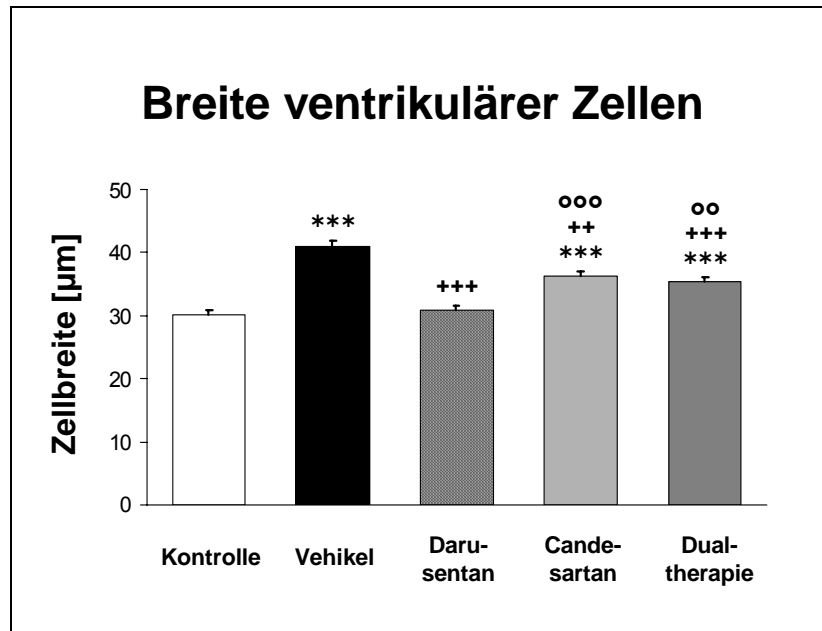
Das Zellvolumen der ventrikulären Kardiomyozyten war in der Vehikel- zur Kontroll-Gruppe von  $83537 \pm 5105 \mu\text{m}^3$  auf  $201566 \pm 11763 \mu\text{m}^3$  hochsignifikant erhöht.

Alle drei Therapiegruppen hatten eine hochsignifikant reduziertes Zellvolumen im Vergleich zur Vehikel-Gruppe. Die Therapie mit Darusentan zeigte den ausgeprägtesten Effekt mit einem Zellvolumen von  $112836 \pm 7048 \mu\text{m}^3$  und wies ein signifikant niedrigeres Zellvolumen auf als Zellen der Candesartan-Gruppe mit  $147441 \pm 6768 \mu\text{m}^3$ . Die Zellen der mit Dualtherapie behandelten Tiere zeigten eine signifikante Reduktion auf  $135045 \pm 7762 \mu\text{m}^3$  zur Vehikel-Gruppe ohne signifikant unterschiedlich zur Darusentan- oder Candesartan-Gruppe zu sein (Diagramm 3.9).



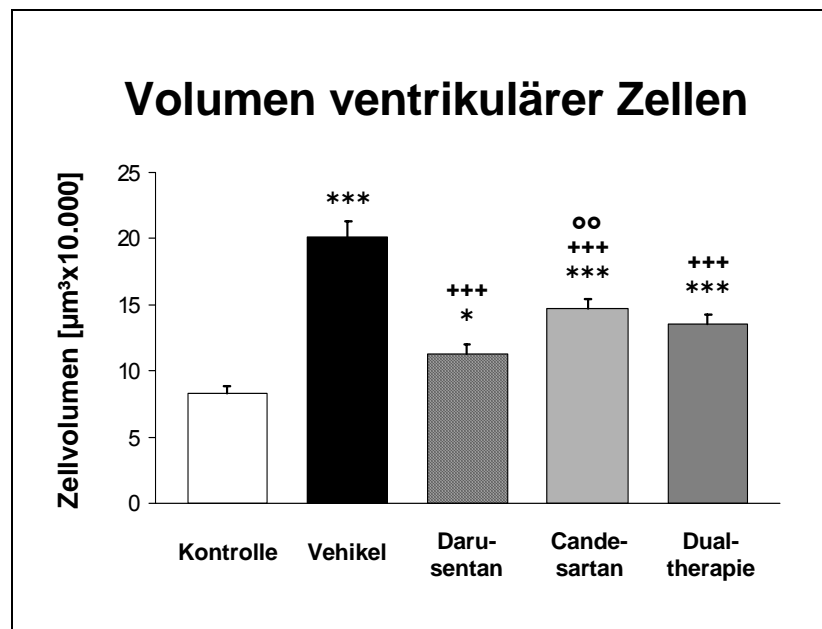
**Diagramm 3.7:** Länge der ventrikulären Kardiomyozyten der Kontroll- und der therapierten Shunttiere.

\*\*\* =  $p < 0,001$  (vs. Kontrolle); ++ =  $p < 0,01$  (vs. Vehikel); o =  $p < 0,05$  (vs. Darusentan).



**Diagramm 3.8:** Breite der ventrikulären Kardiomyozyten der Kontroll- und der therapierten Shunttiere.

\*\*\* =  $p < 0,001$  (vs. Kontrolle); ++ =  $p < 0,01$  (vs. Vehikel); +++ =  $p < 0,001$  (vs. Vehikel); oo =  $p < 0,01$  (vs. Darusentan); ooo =  $p < 0,001$  (vs. Darusentan).

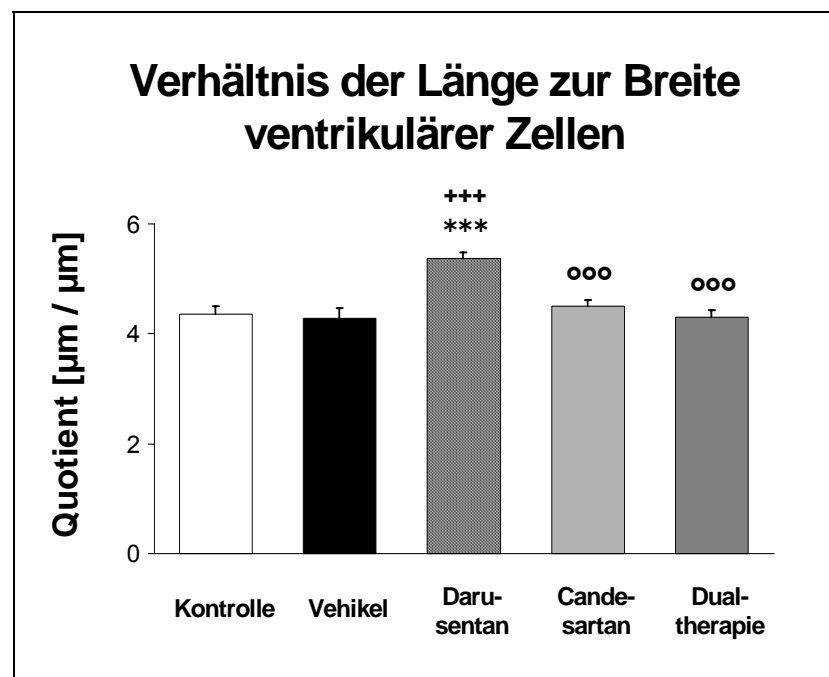


**Diagramm 3.9:** Volumen der ventrikulären Kardiomyozyten der Kontroll- und der therapierten Shunttiere.

\* =  $p < 0,05$  (vs. Kontrolle); \*\*\* =  $p < 0,001$  (vs. Kontrolle); +++ =  $p < 0,001$  (vs. Vehikel); oo =  $p < 0,01$  (vs. Darusentan).

Durch die Darusentan-Therapie konnte die Zelllänge nicht reduziert werden. Die Zellbreite der Shunttiere mit Darusentan-Therapie fand sich aber hochsignifikant reduziert im Vergleich zur Zellbreite der vehikelbehandelten Tiere. Zur Beschreibung dieser veränderten Morphologie wurde der Quotient der Zelllänge zur -breite errechnet.

Dabei ergab sich für die Zellen der Kontroll-, Vehikel-, Candesartan- und Dualtherapie-Gruppe ein gleiches Verhältnis der Länge der Zellen zu ihrer Breite. Die Zellen der Darusentan-Gruppe wiesen eine Erhöhung des Quotienten auf, das heißt, dass die Zelllänge in Relation zur Zellbreite zugenommen hatte bzw. visuell als lang und schmal erkennbar waren. Der Effekt war gegenüber allen anderen Gruppen hochsignifikant (Diagramm 3.10).



**Diagramm 3.10:** Verhältnis der Länge zur Breite der ventrikulären Kardiomyozyten der Kontroll- und der therapierten Shunttiere.

\*\*\* =  $p < 0,001$  (vs. Kontrolle); +++ =  $p < 0,001$  (vs. Vehikel); ooo =  $p < 0,001$  (vs. Darusentan).

### 3.3.2 Morphologie atrialer Zellen

Die Zelllänge und -breite der isolierten atrialen Kardiomyozyten der vehikelbehandelten Shunttiere zeigte eine hochsignifikante Zunahme im Vergleich zu den Zellen der Kontrolltiere.

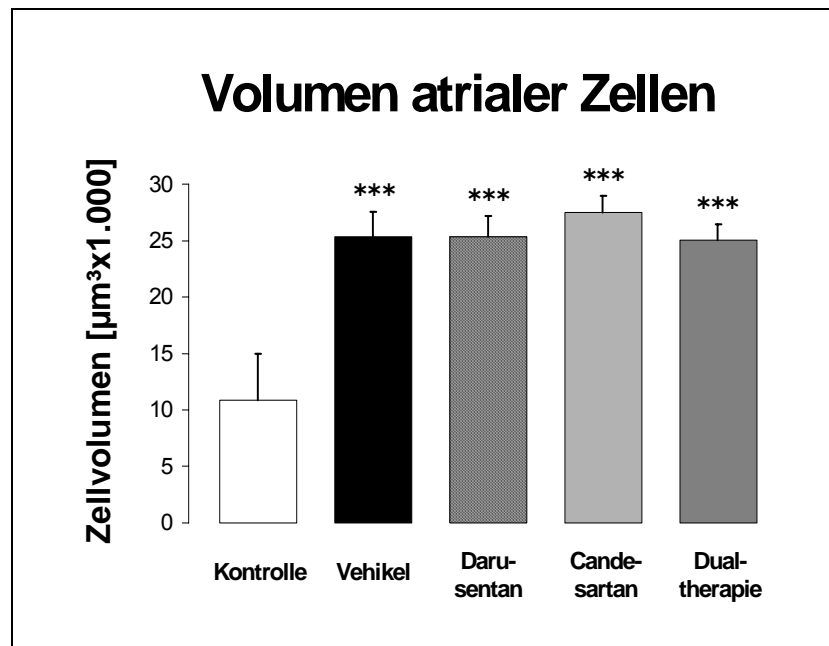
Die Therapien konnten die Zelllänge und -breite nicht reduzieren. Das Verhältnis der Länge zur Breite der Zellen der Shunttiere war im Vergleich zu den Zellen der Kontrolltiere nicht verändert (Tabelle 3.4).

Parameter	Kontrolle	Vehikel	Darusan	Candesartan	Dualtherapie
Zelllänge (µm)	89±1,7	119±5,0***	125±5,4***	128±3,0***	119±3,5***
Zellbreite (µm)	13,0±0,3	17,8±0,7***	17,2±0,5***	17,8±0,5***	17,6±0,4***
Länge / Breite (µm/µm)	7,15±0,3	7,0±0,4***	7,6±0,3***	7,4±0,2***	7,0±0,3***

**Tabelle 3.4:** Morphologische Parameter der isolierten atrialen Kardiomyozyten der Kontroll- und der therapierten Shunttiere.

\*\*\* =  $p < 0,001$  (vs. Kontrolle).

Das Volumen der atrialen Zellen war in der Vehikel-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe von  $10857 \pm 417 \mu\text{m}^3$  auf  $25399 \pm 2170 \mu\text{m}^3$  hochsignifikant erhöht. Die Therapien zeigten keinen Einfluss auf das Volumen der Zellen im Vergleich zur Vehikel-Gruppe. Keine der drei medikamentösen Therapien konnte einen antihypertrophen Effekt auf atriale Kardiomyozyten ausüben (Diagramm 3.11).



**Diagramm 3.11:** Volumen der atrialen Kardiomyozyten der Kontroll- und der therapierten Shunttiere.

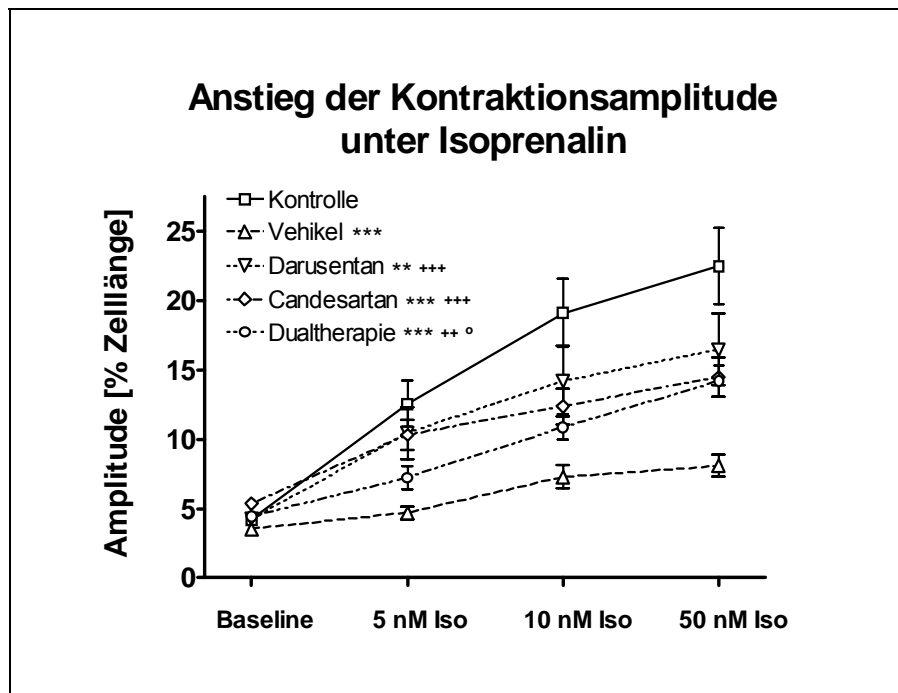
\*\*\* =  $p < 0,001$  (vs. Kontrolle).

### 3.3.3 Kontraktionsparameter isolierter Kardiomyozyten

#### a) Kontraktionsamplitude

Die Kontraktionsamplitude ventrikulärer Kardiomyozyten unter Stimulation durch den  $\beta$ -Rezeptor-Agonisten Isoprenalin fand sich bei Zellen vehikelbehandelter Shunttiere hochsignifikant reduziert im Vergleich zur Kontraktionsamplitude von Zellen der Kontrolltiere.

Die Zellen der drei Therapiegruppen zeigten eine signifikante Verbesserung der Kontraktionsamplitude unter  $\beta$ -Rezeptor-Stimulation im Vergleich zu Zellen der Vehikel-Gruppe und konnten so einen positiven Therapieeffekt anzeigen. Bei Zellen mit Darusentan-Therapie lag ein signifikant verbesserter Anstieg der Kontraktionsamplitude vor im Vergleich zu Zellen mit Dualtherapie ([Diagramm 3.12](#)).



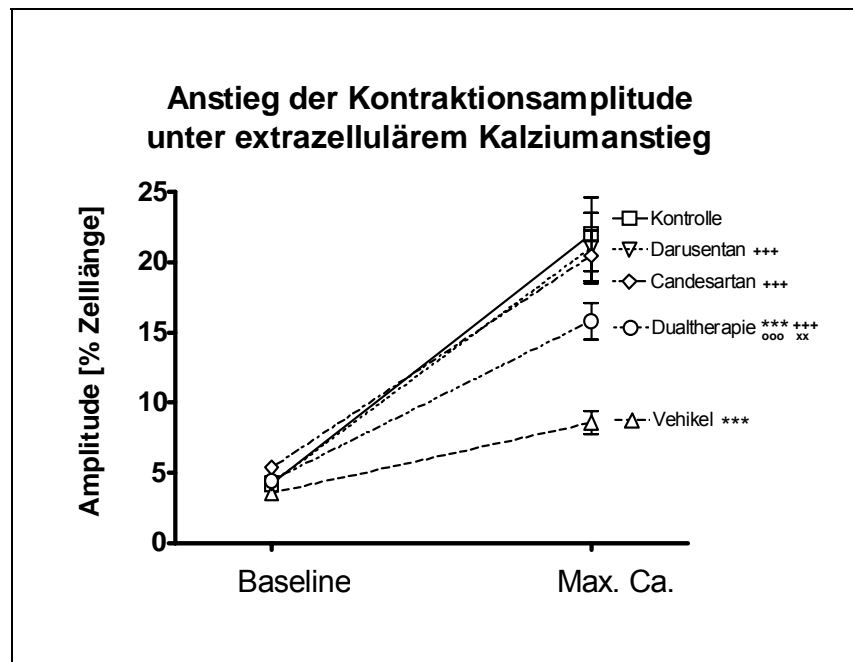
**Diagramm 3.12:** Anstieg der Kontraktionsamplitude der ventrikulären Kardiomyozyten der Kontroll- und der therapierten Shunttiere unter Stimulation mit Isoprenalin (Iso).

\*\* =  $p < 0,01$  (vs. Kontrolle); \*\*\* =  $p < 0,001$  (vs. Kontrolle); ++ =  $p < 0,01$  (vs. Vehikel); +++ =  $p < 0,001$  (vs. Vehikel); ° =  $p < 0,05$  (vs. Darusentan).

Der Anstieg der Kontraktionsamplitude der Zellen der vehikelbehandelter Shunttiere war unter erhöhter extrazellulärer Kalziumkonzentration im Vergleich zu Zellen der Kontrolltiere hochsignifikant vermindert.

Die Kontraktionsamplitude der Zellen der Kontrolltiere unter Stimulation mit 50 nmol Isoprenalin ( $22,5 \pm 2,8$  % Zelllänge) war vergleichbar zur Amplitude derselben Zellen unter erhöhten extrazellulären Kalziumkonzentrationen ( $22,0 \pm 2,6$  % Zelllänge).

Alle drei Therapieformen verbesserten den Anstieg der Kontraktionsamplitude unter erhöhten extrazellulären Kalziumkonzentrationen hochsignifikant im Vergleich zu Zellen vehikelbehandelter Shunttiere. Die Therapien mit Darusentan und Candesartan normalisierten den Anstieg der Kontraktionsamplitude und waren den Zellen der Dualtherapie-Gruppe überlegen (Diagramm 3.13).



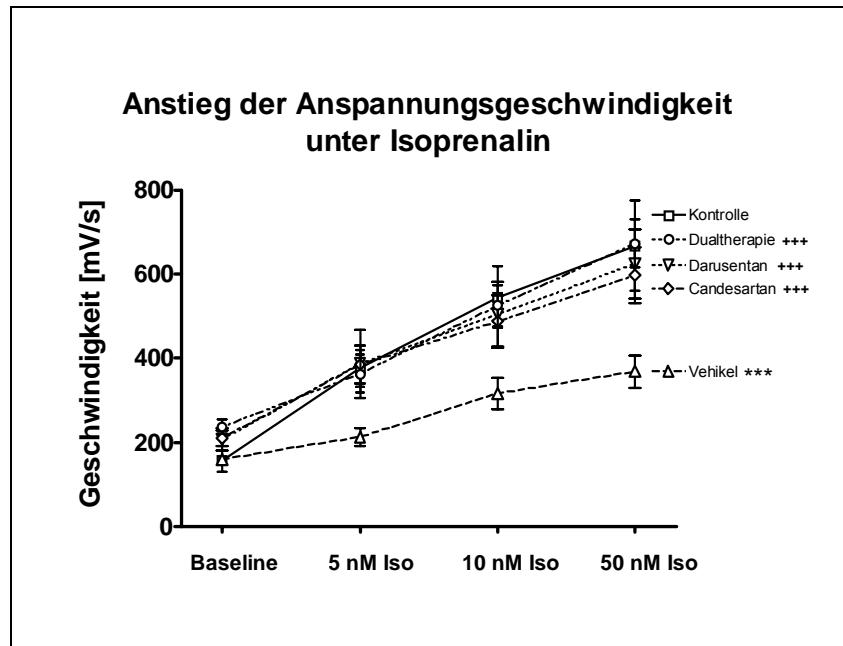
**Diagramm 3.13:** Anstieg der Kontraktionsamplitude der ventrikulären Kardiomyozyten der Kontroll- und der therapierten Shunttiere unter erhöhten extrazellulären Kalziumkonzentrationen (Max. Ca.).

\*\*\* =  $p < 0,001$  (vs. Kontrolle); +++ =  $p < 0,001$  (vs. Vehikel); ooo =  $p < 0,001$  (vs. Darusentan); xx =  $p < 0,01$  (vs. Candesartan).

### b) Anspannungsgeschwindigkeit

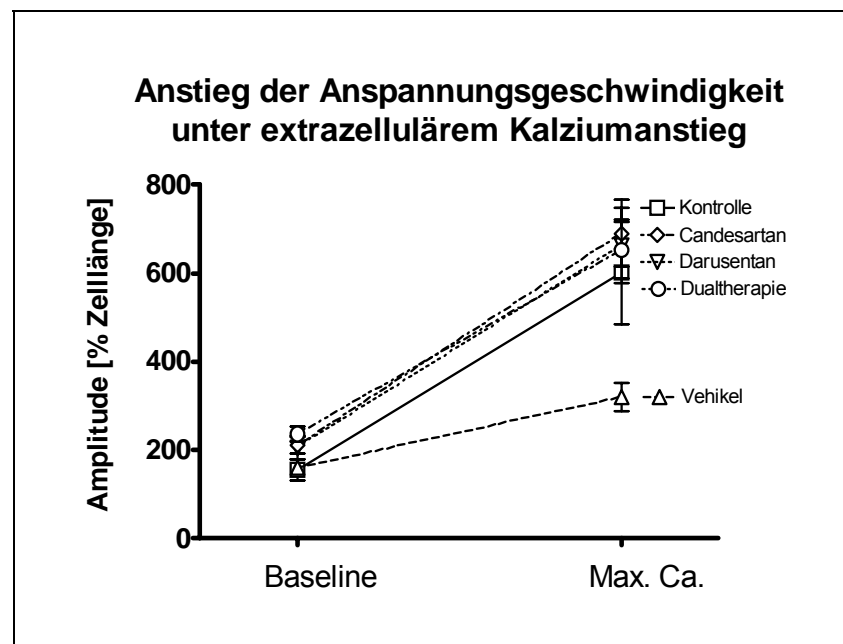
Die Anspannungsgeschwindigkeit der Zellen vehikelbehandelter Shunttiere war unter Stimulation mit Isoprenalin und unter erhöhten extrazellulären Kalziumkonzentrationen hochsignifikant vermindert im Vergleich zu den Zellen der Kontrolltiere.

Die drei Therapien verbesserten die Anspannungsgeschwindigkeit der Zellen hochsignifikant unter Stimulation mit Isoprenalin (Diagramm 3.14) und unter erhöhten extrazellulären Kalziumkonzentrationen (Diagramm 3.15) im Vergleich zu den Zellen vehikelbehandelter Shunttiere und normalisierten sie zur Anspannungsgeschwindigkeit der Zellen der Kontrolltiere.



**Diagramm 3.14:** Anstieg der Anspannungsgeschwindigkeit der ventrikulären Kardiomyozyten der Kontroll- und der therapierten Shunttiere unter Stimulation mit Isoprenalin (Iso).

\*\*\* =  $p < 0,001$  (vs. Kontrolle); +++ =  $p < 0,001$  (vs. Vehikel).



**Diagramm 3.15:** Anstieg der Anspannungsgeschwindigkeit der ventrikulären Kardiomyozyten der Kontroll- und der therapierten Shunttiere unter erhöhter extrazellulärer Kalziumkonzentration (Max. Ca.).

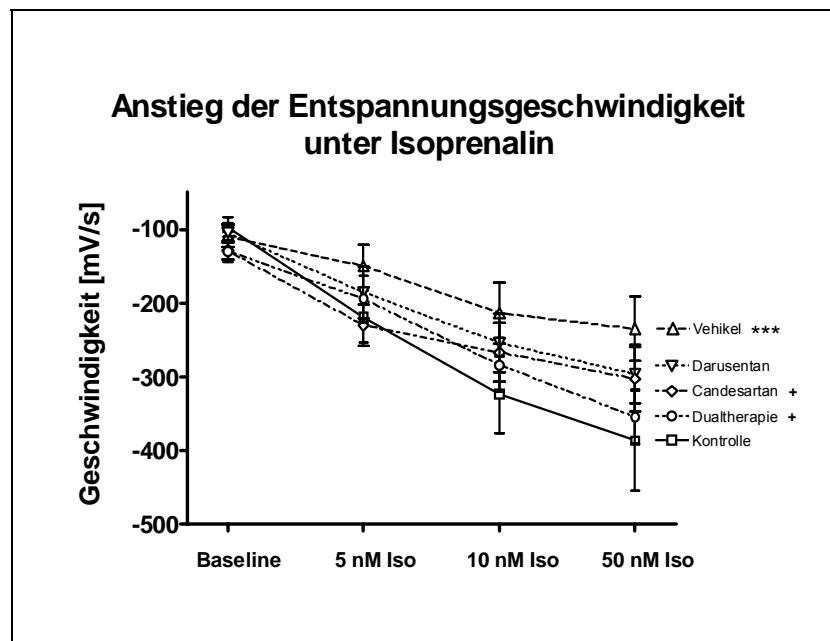
\*\*\* =  $p < 0,001$  (vs. Kontrolle); +++ =  $p < 0,001$  (vs. Vehikel).



### c) Entspannungsgeschwindigkeit

Die Entspannungsgeschwindigkeit der Zellen zeigte bereits unter 10 nM Isoprenalin ihre maximale Antwort und konnte im Gegensatz zur Kontraktionsamplitude und zur Anspannungsgeschwindigkeit durch 50 nM Isoprenalin nicht weiter gesteigert werden. Die Entspannungsgeschwindigkeit der Zellen der vehikelbehandelten Shunttiere unter Stimulation mit Isoprenalin war hochsignifikant vermindert im Vergleich zu Zellen der Kontrolltiere.

Die Therapie mit Candesartan und Dualtherapie verbesserten die Entspannungsgeschwindigkeit der Zellen unter Stimulation mit Isoprenalin im Vergleich zu den Zellen vehikelbehandelter Shunttiere signifikant. Keine Verbesserung auf die Zellen zeigte die Therapie mit Darusentan (Diagramm 3.16).

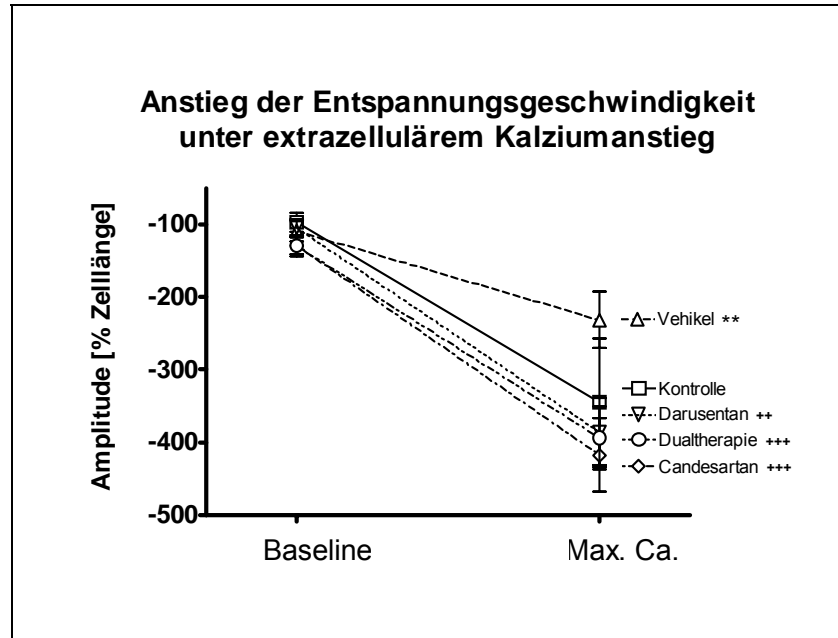


**Diagramm 3.16:** Anstieg der Entspannungsgeschwindigkeit der ventrikulären Kardiomyozyten der Kontroll- und der therapierten Shunttiere unter Stimulation mit Isoprenalin (Iso).

\*\* =  $p < 0,01$  (vs. Kontrolle); + =  $p < 0,05$  (vs. Vehikel).

Der Anstieg der Entspannungsgeschwindigkeit der Zellen der vehikelbehandelten Shunttiere unter erhöhten extrazellulären Kalziumkonzentrationen war hochsignifikant erniedrigt im Vergleich zu Zellen der Kontrolltiere.

Die gewählten Therapieformen verbesserten den verminderten Anstieg im Vergleich zu den Zellen der vehikelbehandelten Shunttiere und normalisierten ihn zu den Zellen der Kontrolltiere (Diagramm 3.17).



**Diagramm 3.17:** Anstieg der Entspannungsgeschwindigkeit der ventrikulären Kardiomyozyten der Kontroll- und der therapierten Shunttiere unter erhöhter extrazellulärer Kalziumkonzentration (Max. Ca.).

\*\* =  $p < 0,01$  (vs. Kontrolle); ++ =  $p < 0,01$  (vs. Vehikel); \*\*\* =  $p < 0,001$  (vs. Vehikel).

## 4 Diskussion

Der Einfluss einer Therapie mit Endothelin- und Angiotensin-Rezeptor-Antagonisten auf die zelluläre Hypertrophie und Kontraktilität bei CHI wurde am Modell des aortokavalen Shunts an der Ratte untersucht. Dieses Modell zeichnet sich neben einer guten Reproduzierbarkeit durch eine rasche Durchführbarkeit der Induktion des aortokavalen Shunts aus<sup>81, 82</sup>.

### 4.1 Hämodynamische Veränderungen des Shuntmodells

In dieser Arbeit fand sich eine gesteigerte Mortalität von 28 % für vehikelbehandelte Shunttiere im Vergleich zu 0 % für Kontrolltiere und ein hochsignifikant vermindertes Wachstum.

Bei vehikelbehandelten Shunttieren wurde ein hochsignifikant erhöhtes absolutes und relatives Herzgewicht gemessen. Der zentralvenöse (ZVD) und der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) waren ebenfalls erhöht bei einer hochsignifikanten Abnahme der myokardialen Kontraktilität (dP/dt). Damit zeigte das Modell des aortokavalen Shunts bei den hämodynamischen Parametern und den Organgewichten die für CHI charakteristischen Veränderungen<sup>93-95</sup>.

Auf die Blutdruckwerte und die Herzfrequenz shuntoperierter Tiere hatten die Therapien keinen Einfluss. In der hier vorgelegten Arbeit wurde die Dosis des Darusentans oder des Candesartans so gewählt, dass keine signifikanten Veränderungen der hämodynamischen Parameter resultierten. Daher sind die zur Vehikel-Gruppe aufgezeigten Veränderungen nicht als Konsequenz eines gesenkten arteriellen Blutdrucks oder einer veränderten Hämodynamik aufzufassen, sondern direkte Konsequenzen des Rezeptorantagonismus.

Die bei vehikelbehandelten Shunttieren erhöhten ANP- und cGMP-Plasmakonzentrationen wiesen auf eine hochsignifikante Aktivierung des ANP-Systems an dem Modell des aortokavalen Shunts hin. Die diuretische und natriuretische Wirkung von ANP wird über seinen second-messenger cGMP vermittelt. Es ist gezeigt, dass ANP zu einem Anstieg der cGMP-Plasmakonzentrationen und der cGMP-Urin-Exkretion führt. Der Anstieg korreliert sehr gut zur biologischen Wirksamkeit von ANP und ist bei CHI

vermindert<sup>12, 13</sup>. In unserer Arbeit ist der verminderte Quotient der Plasmakonzentrationen von cGMP zu ANP Ausdruck der Insuffizienz der Wirkung der natriuretischen Peptide im Rahmen einer CHI.

#### **4.2 Zelluläre Veränderungen des Shuntmodells**

Zellmorphologisch stellte sich eine hochsignifikante Zunahme der Länge, Breite und des Volumens der isolierten ventrikulären Kardiomyozyten der vehikelbehandelten Shunttiere dar.

In Bezug auf die Morphologie und die ausgemessenen Volumina der isolierten, adulten Kardiomyozyten wies diese Arbeit ähnliche Ergebnisse an dem Modell des aortokavalen Shunts auf wie die von Liu et al.<sup>93</sup> und Gerdes et al.<sup>96</sup> und ähnelt den Ergebnissen an anderen Modellen<sup>97-99</sup> sowie an menschlichen Kardiomyozyten<sup>100, 101</sup>.

Die Kontraktionsanalyse zeigte einen verminderten Anstieg der Kontraktionsamplitude, der Anspannungs- und der Entspannungsgeschwindigkeit der ventrikulären Kardiomyozyten der vehikelbehandelten Shunttiere im Vergleich zu Zellen der Kontrolltiere unter Stimulation mit Isoprenalin und unter erhöhter extrazellulärer Kalziumkonzentration.

Kontraktionscharakteristika der isolierten ventrikulären Kardiomyozyten für das Modell des aortokavalen Shunts wurden bisher nicht beschrieben. Diese Arbeit konnte somit auf zellulärer Ebene Zeichen einer Insuffizienz nicht nur im Sinne einer zellulären Hypertrophie, sondern zum ersten Mal auch die verminderte Kontraktionsantwort bei CHI aufzeigen, wie sie bei dieser Erkrankung ja auch zu erwarten ist.

Die veränderten zellulären Parameter gingen einher mit den charakteristischen Veränderungen der hämodynamischen Parameter und den Herzgewichten beim Krankheitsbild der CHI. Damit wurde gezeigt, dass das Modell des aortokavalen Shunts auch auf zellulärer Ebene die Charakteristika der CHI aufweist.

Die Shunt-induzierte Hypertrophie der atrialen Kardiomyozyten war in dieser Arbeit durch die verabreichten AT<sub>1</sub>-R- und ET<sub>A</sub>-R-Antagonisten nicht beeinflussbar. Im Gegensatz dazu zeigten sich in ventrikulären Zellen unter Darusentan- und Candesartantherapie sowie unter Dualtherapie antihypertrophe Effekte. Die Hypertrophie der atrialen Zellen in diesem Ratten-

Modell war entweder unabhängig vom ET<sub>A</sub>- und AT<sub>1</sub>-Rezeptor oder die eingesetzten Dosierung von Darusentan oder Candesartan waren zu niedrig. In der Literatur fand sich kein Hinweis auf eine antihypertrophe Wirkung von neurohumoralen Faktoren auf atriale Kardiomyozyten.

### **4.3 Effekte einer AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Blockade**

#### **4.3.1 Einfluss einer AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Blockade auf Organgewichte und Hämodynamik**

Candesartan senkte die Mortalität von 28 % in der Vehikel-Gruppe auf 10 % und verbesserte das verminderte Wachstum der Tiere im Vergleich zu vehikelbehandelten Shunttieren hochsignifikant. Richer et al.<sup>45</sup>, Milavetz et al.<sup>47</sup> und Linz et al.<sup>46</sup> fanden für AT<sub>1</sub>-R-Antagonisten bei Ratten ebenfalls einen positiven Einfluss bezüglich des Überlebens.

Sowohl das absolute als auch das relative Herzgewicht der Tiere wurde durch AT<sub>1</sub>-R-Antagonisten im Vergleich zu vehikelbehandelten Shunttieren gesenkt. Dieser antihypertrophe Effekt war für das relative Herzgewicht hochsignifikant. Qing et al.<sup>102</sup>, Schieffer et al.<sup>103</sup> und Linz et al.<sup>46</sup> zeigten einen antihypertrophen Effekt durch AT<sub>1</sub>-R-Antagonisten auf den linken und rechten Ventrikel an verschiedenen Modellen der CHI. Zusätzlich fanden Liu et al.<sup>44</sup> und Loennechen et al.<sup>104</sup> für den linken und Ambrose et al.<sup>105</sup> für den rechten Ventrikel antihypertrophe Effekte unter AT<sub>1</sub>-R-Blockade.

Des Weiteren senkte die Therapie mit Candesartan den ZVD und den LVEDP signifikant im Vergleich zur Vehikel-Gruppe und wies damit eine positive Therapiewirkung auf die Hämodynamik von Ratten mit aortokavalen Shunt auf. In der Literatur wurde im Vergleich zu erhöhten LVEDP-Werte einer Vehikel-Gruppe ebenfalls eine Senkung durch verschiedene AT<sub>1</sub>-R-Antagonisten gefunden<sup>43, 102, 104, 106</sup>.

Die in dieser Arbeit vorgelegten Daten zur antihypertrophen Wirkung und zur Hämodynamik unterstreichen die positive therapeutische Wirkung von Candesartan am CHI-Modell des aortokavalen Shunts der Ratte. Diese Ergebnisse stimmen gut mit den in der Literatur veröffentlichten Daten zum AT<sub>1</sub>-R-Antagonismus an verschiedenen anderen Modellen für experimentelle CHI überein.

### **4.3.2 Einfluss einer AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Blockade auf zelluläre Parameter**

Auf zellulärer Ebene war Candesartan in der Lage die zelluläre Hypertrophie im Vergleich zu vehikelbehandelten Shunttieren zu reduzieren. Unsere Daten zeigen, dass Candesartan in der Lage ist, in Bezug auf das Herzgewicht und das Zellvolumen antihypertrophe Effekte auszuüben.

Studien für CHI mit AT<sub>1</sub>-R-Antagonisten bestätigten die Daten unserer Arbeit sowohl bezüglich der Messungen an isolierten Kardiomyozyten<sup>104</sup> als auch bei Bestimmung der „Myocyte-Cross-Sectional-Area“ in histologischen Schnitten<sup>44, 107</sup>.

Die Analyse der Funktionsparameter der Kardiomyozyten zeigte, dass Candesartan in der Lage war, die verminderte Kontraktionsantwort im Vergleich zu den Zellen vehikelbehandelter Shunttiere in allen Qualitäten zu verbessern, und somit positive Effekte auf kardiomyozytäre Funktionsparameter ausübte.

Das entspricht den für Losartan (AT<sub>1</sub>-R-Antagonist) an Ratten mit koronarer Arterienligatur gezeigten Effekten<sup>104</sup>. Weitere Studien mit Kontraktionsanalysen isolierter Kardiomyozyten unter einer Blockade des AT<sub>1</sub>-R sind uns nicht bekannt.

Candesartan als etablierte Therapie der CHI hatte somit an unserem Modell der experimentellen CHI nicht nur eine positive Wirkung auf das Herzgewicht und die hämodynamischen Parameter, sondern zeichnete sich auch durch ausgeprägte zelluläre antihypertrophe Effekte und durch eine Verbesserung der zellulären Kontraktionsantwort aus.

## **4.4 Effekte einer ET<sub>A</sub>-Rezeptor-Blockade**

### **4.4.1 Einfluss einer ET<sub>A</sub>-Rezeptor-Blockade auf Organgewichte und Hämodynamik**

In dieser Arbeit senkte Darusentan die Mortalität von 28 % in der Vehikel-Gruppe auf 4 % und verbesserte das verminderte Wachstum der Tiere im Vergleich zu vehikelbehandelten Shunttieren hochsignifikant.

Die Überlebensdaten der Tiere zeigten bei geringer Tierzahl und einem kurzem Beobachtungszeitraum nur eine tendenzielle Verbesserung aller drei Therapien. Ein statistischer Unterschied zwischen den Therapien war nicht nachweisbar.

In dieser Arbeit hatten die mit Darusentan behandelten Shunttiere ein niedrigeres relatives Herzgewicht, einen signifikant niedrigeren LVEDP und eine höhere ventrikuläre Kontraktilität im Vergleich zu Vehikelbehandelten Shunttieren.

Sakai et al.<sup>74</sup> fanden an Ratten mit koronarer Arterienligatur eine fast komplette Reduktion der Hypertrophie beider Ventrikel durch BQ-123 (**ET<sub>A</sub>-R-Antagonist**) nach zwölf Wochen. Unsere Daten ähneln denen anderer Autoren, die ET-R-Antagonisten in CHI-Modellen einsetzten<sup>108-111</sup>.

Eine Senkung des LVEDP und ein Anstieg der dP/dt wurde durch ET<sub>A/B</sub>- und ET<sub>A</sub>-R-Antagonismus an Hunden und Ratten mit koronarer Arterienligatur nach drei bis neun Monaten gezeigt<sup>72, 74, 110</sup> sowie an kardiomyopathischen Hamstern nach neun Wochen<sup>109</sup>.

Im Gegensatz dazu fanden aber Fraccarollo et al.<sup>112</sup> keinen positiven Therapieeinfluss durch Darusentan an Ratten mit Myokardinfarkt und Hu et al.<sup>113</sup> gar am gleichen Modell eine Verschlechterung zur Vehikel-Gruppe durch EMD94246 (**ET<sub>A</sub>-R-Antagonist**) nach acht Wochen.

Bei einer Literaturrecherche finden sich eine Reihe von Studien mit experimenteller CHI, die einen positiven Effekt eines ET-R-Antagonismus sowohl für ET<sub>A/B</sub>-<sup>72, 110</sup> als auch für ET<sub>A</sub>-R-Antagonisten<sup>74, 109</sup> zeigen konnten. Ein Unterschied zwischen den Studien ergibt sich aus der Versuchsdauer bzw. den Messzeitpunkten. So fanden Sakai et al.<sup>74</sup> und Mulder et al.<sup>72</sup> nach ein bis zwei Monaten keine Effekte durch ET-R-Antagonisten, um dann nach drei bzw. neun Monaten positive Effekte zeigen zu können. Yamauchi-Kohno et al.<sup>109</sup> beobachteten initial Zeichen der Dekompensation, um nach neun Wochen positive Effekte zu finden. Diese Studien legten ebenso wie unsere Daten zum Zeitverlauf der Mortalität der Darusentan-Gruppe nahe, dass der Zeitpunkt der Datenerhebung zur Abschätzung der Wirkungen eines ET-R-Antagonisten einen wichtigen Faktor darstellen könnte.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten zeigten keine Beeinflussung der ANP-Plasmaspiegel durch eine der gewählten Therapien. Zur Untersuchung der Effizienz des Systems der natriuretischen Peptide (**NP**) als Gegenspieler zum RAAS<sup>11</sup> wurden die ANP-Plasmaspiegel in Relation zu den cGMP-Plasmaspiegel gesetzt<sup>12</sup>. Der Anstieg des Quotienten korreliert sehr gut zur biologischen Wirksamkeit von ANP und ist bei CHI vermindert<sup>12, 13</sup>. In vitro ist

die Aktivierung des ET<sub>A</sub>-R in atrialen Kardiomyozyten ein Sekretionsstimulus für ANP und die ET<sub>A</sub>-R-Blockade vermindert die ANP-Freisetzung bei Dehnung<sup>11, 15</sup>. Bei CHI finden sich erhöhte ET-1-Plasmakonzentrationen<sup>70, 71</sup>, so dass eine chronische Darusentan-Therapie die Dauerstimulation des Systems der NP's senkt und die diuretische und natriuretische Wirkung der NP's verbessert.

Philipp et al.<sup>114</sup> zeigten ähnliche Ergebnisse durch Darusentan an Menschen mit CHI über 21 Tagen. Der Quotient der Plasmaspiegel aus cGMP zu BNP wurde durch Darusentan signifikant erhöht. Die ANP- und BNP-Plasmaspiegel wurde durch Darusentan nicht beeinflusst.

Die Daten dieser Arbeit unterstreichen die positive therapeutische Wirkung von Darusentan bezüglich einer antihypertrophen Wirkung und einer Besserung der Hämodynamik am CHI-Modell des aortokavalen Shunts an der Ratte.

#### **4.4.2 Einfluss einer ET<sub>A</sub>-Rezeptor-Blockade auf zelluläre Parameter**

Darusentan reduziert auf zellulärer Ebene die Hypertrophie im Vergleich zu vehikelbehandelten Shunttieren. Im Vergleich zu Candesartan weist Darusentan eine stärkere antihypertrophe Wirkung auf die Kardiomyozyten auf.

Diese Daten zeigen, dass ET<sub>A</sub>-R-Antagonismus mit Darusentan sowohl in Bezug auf das Herzgewicht als auch auf das Volumen isolierter Kardiomyozyten antihypertrophe Effekte ausübte.

Die Daten bestätigten für ET<sub>A</sub>-R-Antagonismus vorhandene Arbeiten mit Verbesserung der „Myocyte-Cross-Sectional-Area“ (MCSA) an histologischen Schnitten<sup>74, 110, 115</sup>. Die hier vorgelegte Arbeit ist aber die erste Studie, die antihypertrophe Effekte durch ET<sub>A</sub>-R-Antagonisten an isolierten ventrikulären Kardiomyozyten darlegt.

Die Zellen mit Darusentan behandelte Shunttiere zeigten im Vergleich zu vehikelbehandelten Shunttieren keinen Effekt in Bezug auf die Zelllänge, aber eine ausgeprägte Reduktion der Zellbreite. Somit waren die Zellen der Darusentan-Gruppe elongiert und schmal, was sich durch den erhöhten Quotienten von Länge zu Breite in Bezug auf alle anderen untersuchten Gruppen ausdrückte.

Bisher wurde der Einfluss von ET-R-Antagonismus auf die MCSA in Histologien<sup>74, 110, 115</sup> oder die Länge von isolierten Kardiomyozyten<sup>111, 116</sup>



gezeigt, aber in keinem Artikel wurden Daten sowohl zur Zellbreite als auch zur Zelllänge und deren Relation gezeigt.

In der Arbeit von Gerdes et al.<sup>117</sup> wurde gezeigt, dass eine solche Veränderung der Kardiomyozyten mit Zunahme der Zelllänge bei konstanter Zellbreite mit einer Dilatation des Ventrikels korrelierte. Wiederum Gerdes et al. stellte dar, dass im Rahmen einer hypertrophen Antwort ohne ventrikuläre Dilatation, z. B. durch experimentelle arterielle Hypertonie, der Quotient von Länge zu Breite sank, bei anderen Hypertrophieformen wie beim aortokavalem Shunt nicht verändert war. Bei Zuständen hingegen, die mit einer ventrikulären Dilatation im Rahmen einer Herzinsuffizienz einhergehen, zeigte sich eine Steigerung des Quotienten als Ausdruck der Dilatation auf zellulärer Ebene<sup>118</sup>.

In der Studie von Hu et al.<sup>113</sup> fand sich ein negativer Effekt einer direkt nach Induktion begonnenen Therapie durch ET-R-Antagonisten. Die Daten zeigten eine Dilatation des Ventrikels.

Die hier vorgelegten Daten könnten somit die Aussage von Hu et al.<sup>113</sup> unterstreichen, dass eine Therapie mit Darusentan auch negative Effekte haben könnte, da wir mit langen, schmalen Kardiomyozyten zelluläre Zeichen einer Dilatation fanden. In dieser Arbeit aber überwiegen die positiven Einflüsse auf die Entwicklung der Hypertrophie und die Kontraktilität bei CHI durch Darusentan. Deshalb könnte es Ausdruck verschiedener Zeitfenster in der Beeinflussbarkeit der CHI sein mit einem langfristig positiven Einfluss durch die starke Reduktion der Hypertrophie.

Es könnte aber auch einen negativen Einfluss durch eine starke Hemmung von notwendigen Adaptionsmechanismen über die Proteinkinase C (PKC) geben<sup>125</sup>. Denn kurzfristig können nach der Induktion des aortokavalen Shunts diese Adaptionsmechanismen essentiell für ein Überleben sein, damit die Herzkraft für die erhöhten Anforderungen in ausreichendem Maße gesteigert werden kann.

Die Analyse der Kontraktionsparameter der Kardiomyozyten zeigte, dass die Zellen der mit Darusentan behandelten Tiere in Bezug auf den Anstieg der Kontraktionsamplitude und der Anspannungsgeschwindigkeit unter Stimulation mit Isoprenalin hochsignifikant zu Zellen vehikelbehandelter Shunttiere verbessert waren. Das entspricht den für Bosentan (ET<sub>A/B</sub>-R-Antagonist) an Schweinen mit Rapid-Ventricular-Pacing<sup>119</sup> dargestellten Effekten. Für die

Entspannungsgeschwindigkeit fand sich hingegen keine Verbesserung zur Vehikel-Gruppe. Unter erhöhten extrazellulären Kalziumkonzentrationen wiesen die Zellen der mit Darusentan behandelte Tiere in allen Kontraktionsparametern eine hochsignifikante Verbesserung zu vehikelbehandelten Shunttieren auf.

Darusentan zeigte in unserer Arbeit im Vergleich zu vehikelbehandelten Shunttieren zelluläre, antihypertrophe Effekte und eine Verbesserung der Stimulierbarkeit der Kontraktion der Kardiomyozyten.

#### **4.5 Effekte einer kombinierten AT<sub>1</sub>- und ET<sub>A</sub>-Rezeptor-Blockade**

##### **4.5.1 Einfluss einer kombinierten AT<sub>1</sub>- und ET<sub>A</sub>-Rezeptor-Blockade auf Organgewichte und Hämodynamik**

In dieser Arbeit senkte die Dualtherapie mit Candesartan und Darusentan die Mortalität von 28 % in der Vehikel-Gruppe auf 11 % und verbesserte das verminderte Wachstum der Tiere im Vergleich zu vehikelbehandelten Shunttieren. Diese Arbeit ist unseren Wissens nach die erste Studie, die positive Effekte einer kombinierten AT<sub>1</sub>-R- und ET<sub>A</sub>-R-Blockade auf die Mortalität und das Wachstum der Tiere darlegt.

Die Dualtherapie zeigte zwar einen geringeren Effekt auf das Wachstum auf als beide Monotherapien. Die Bewertung der Unterschiede zwischen den verschiedenen Therapien ist aber in unserer Arbeit nicht möglich, da zur Beurteilung wichtige Wirkungen der Medikamente wie die diuretischen oder metabolischen Effekte nicht erfasst wurden.

Das relative Herzgewicht wurde im Vergleich zu vehikelbehandelten Shunttieren durch eine Dualtherapie hochsignifikant vermindert, ohne aber einen positiven, additiven Einfluss im Vergleich zu den Monotherapien aufzuweisen.

Beide Monotherapien senkten den LVEDP signifikant zur Vehikel-Gruppe und legten damit eine positive Therapiewirkung dar. Die Dualtherapie-Gruppe zeigte zusätzlich noch einen additiven Effekt, so dass zu beiden Monotherapiegruppen ein signifikanter Unterschied entstand und der LVEDP auf das Niveau von gesunden Tieren gesenkt wurde. Des Weiteren war die Dualtherapie in der Lage den ZVD zu senken und die ventrikuläre Kontraktilität

zu steigern. Somit legten die hämodynamischen Parameter nahe, dass die Tiere von einer Dualtherapie profitieren könnten.

In der hier vorgelegten Arbeit zeigten die Parameter der Hämodynamik und die relativen Herzgewichte, dass alle drei Therapiegruppen in der Lage waren in Bezug auf diese Parameter einen positiven Therapieeffekt zu erzeugen. Des Weiteren zeigte sich eine tendenzielle Überlegenheit der Dual- zu den Monotherapien in den hämodynamischen Parametern.

Eine Studie mit einer Dualtherapie aus ET<sub>A</sub>- und AT<sub>1</sub>-R-Antagonisten bei experimenteller CHI, die die Hämodynamik oder Hypertrophiemarker untersuchte, gab es bisher nicht.

Fraccarollo et al.<sup>112</sup> verglich eine Dualtherapie mit ET<sub>A</sub>-R-Antagonismus und ACE-Inhibition mit den jeweiligen Monotherapien. Zwar zeigten sich keine Therapieeffekte durch die Monotherapien, bei Kombination beider Substanzen aber fanden sie hingegen Effekte in Bezug auf den LVEDP und die dP/dt und eine positive Beeinflussung der Transkription von Hypertrophiegenen. Brent New et al.<sup>119</sup> zeigten im Vergleich zu den Monotherapien stärkere Effekte einer Dualtherapie mit Valsartan und Bosentan auf die echokardiographische Geometrie und die Kontraktionsfunktion des linken Ventrikels.

Die Ergebnisse von Fraccarollo et al., Brent New et al. und unsere Daten zu Parametern der Hämodynamik unterstützen den Nutzen einer Dualtherapie gegenüber den Monotherapien.

#### **4.5.2 Einfluss einer kombinierten AT<sub>1</sub>- und ET<sub>A</sub>-Rezeptor-Blockade auf zelluläre Parameter**

Die Dualtherapie war in der Lage die zelluläre Hypertrophie der vehikelbehandelten Shunttiere ebenso wie die Monotherapien hochsignifikant zu reduzieren. Unter den Therapien zeigte Darusentan in Bezug auf das Zellvolumen den stärksten Effekt. In der Dualtherapie-Gruppe ergab sich durch das additiv applizierte Candesartan kein zusätzlichen Effekt im Vergleich zur Monotherapie mit Darusentan.

Dies könnte durch den gemeinsamen intrazellulären Signaltransduktionsweg bedingt sein. Sowohl der ET<sub>A</sub>- als auch der AT<sub>1</sub>-R aktivieren über die Proteinkinase C (PKC), mitogen-aktivierte Protein-Kinase (MAP-Kinase) und

die extrazelluläre Signal-regulierte Protein Kinase (ERK) die selben Wege zur Steigerung der Transskription der Hypertrophiegene<sup>36, 120-123</sup>.

Zwischen der intrazellulären Signaltransduktion des ET<sub>A</sub>- und AT<sub>1</sub>-R zeigte sich ein Unterschied in einer zusätzlichen Aktivierung des ET-Systems über einen positiven Feedback-Mechanismus über den ET<sub>A</sub>- und ET<sub>B</sub>-R<sup>123, 124</sup>. Dieser autokrine Mechanismus konnte für das RAAS bisher nicht nachgewiesen werden.

Beim ET<sub>A</sub>-R-Antagonismus wäre auch eine über den ET<sub>B</sub>- Rezeptor erfolgende Aktivierung des NO-Systems<sup>67</sup> ein möglicher Weg einer Antihypertrophie<sup>125, 126</sup>. Bei Blockade des ET<sub>A</sub>-R führt eine Aktivierung des AT<sub>1</sub>-R zur Aktivierung des positiven Feedback-Mechanismus des Endothelin-Systems. Dadurch wird durch eine zusätzliche Blockade des AT<sub>1</sub>-R die antihypertrophe Wirkung über den ET<sub>B</sub>-R abgeschwächt. Dieser Mechanismus könnte der Grund sein, dass eine kombinierte ET<sub>A</sub>- und AT<sub>1</sub>-R-Blockade keinen zusätzlichen Effekt im Vergleich zu einer Monotherapie mit Darusentan zeigt. Da das Versuchsdesign dieser Arbeit aber nicht darauf angelegt war, intrazelluläre Signaltransduktionswege zu untersuchen, bleiben diese Darlegung nur Vermutungen.

Während die Länge der Zellen mit Darusentan und Candesartan als Monotherapie keine Abnahme im Vergleich zur Vehikel-Gruppe zeigten, waren die Zellen der Dualtherapie-Gruppe signifikant kürzer. Der in der Darusentan-Gruppe erhöhte Quotient von Zelllänge zu -breite war im Vergleich zur Kontroll- und zur Vehikel-Gruppe bei dualtherapierten Shunttieren unverändert. Da eine Steigerung des Quotienten bei Zuständen vorgefunden wurde, die mit einer ventrikulären Dilatation im Rahmen einer Herzinsuffizienz einhergehen<sup>118</sup>, könnte die Rückbildung der auffälligen Morphologie durch additiv gegebenes Candesartan ein Hinweis auf eine im Verlauf des Versuches günstigere hämodynamische Situation sein.

Unsere Daten sprechen für eine Kombinationstherapie mit Darusentan und Candesartan, da nur eine Dualtherapie eine Verminderung der Zelllänge bei unverändertem Quotient von Zelllänge zu Breite bewirkte.

Bei den mit Dualtherapie behandelten Tiere war die Stimulierbarkeit der ventrikulären Kardiomyozyten unter Isoprenalin und unter erhöhten

extrazellulären Kalziumkonzentration in Bezug auf alle gemessenen Parameter im Vergleich zu den Zellen vehikelbehandelter Shunttiere besser.

Der Anstieg der Kontraktionsamplitude sowohl unter Isoprenalin als auch bei erhöhten extrazellulären Kalziumkonzentrationen war bei mit der Dualtherapie behandelten Tieren vermindert im Vergleich zur Darusentan-Gruppe. Dagegen wurde der Anstieg der Entspannungsgeschwindigkeit unter Isoprenalin nur durch die Candesartan- und Dualtherapie signifikant verbessert. Somit verbesserte zwar die Darusentan-Gruppe die Kontraktionsamplitude am ausgeprägtesten, verbesserte aber nicht wie Candesartan und eine Dualtherapie unter Stimulation durch Isoprenalin alle Kontraktionsparameter.

Brent New et al.<sup>119</sup> wiesen an Schweinen mit „Rapid-Ventricular-Pacing“ synergistische Effekte einer Therapie mit Bosentan und Valsartan auf die echokardiographische Geometrie und Kontraktionsfunktion des linken Ventrikels nach. Die Analyse der Kontraktionsparameter zeigte ausgeprägtere Effekte einer ET<sub>A/B</sub>-R-Blockade und einer Dualtherapie im Vergleich zum AT<sub>1</sub>-R-Antagonismus unter Stimulation mit Isoprenalin und erhöhtem extrazellulären Kalzium. Die Daten legten dieselben Effekte eines ET-R-Antagonismus dar wie unserer Arbeit.

Kontraktionsanalysen anderer Arbeitsgruppen an isolierten Kardiomyozyten unter einer Blockade des RAAS und des ET<sub>A</sub>-R sind uns nicht bekannt.

Die Funktionsparameter der isolierten, adulten Kardiomyozyten zeigen insgesamt dieselbe Tendenz wie die Morphologieparameter. Zwar ist die Kontraktionsamplitude der Darusentan-Gruppe unter den Therapieformen die beste, aber dieser Effekt wurde durch den verminderten Anstieg der Entspannungsgeschwindigkeit als Zeichen einer verminderten Relaxation relativiert. Darin zeigen sich die Candesartan- und Dualtherapie-Gruppe überlegen. Parallel dazu zeigen die Zellen der Darusentan-Gruppe zwar die stärksten, antihypertrophen Effekte, zeigen aber auch eine veränderte Morphologie im Sinne elongierter, dünner Zellen (siehe Kapitel 4.4), wohingegen Zellen der Candesartan- und Dualtherapie-Gruppe diesen Effekt nicht zeigten.

Zudem legte der Bezug der zellulären Parameter zu den Parametern der Hämodynamik eine Relativierung der starken Therapiewirkung des

Darusentans auf die Kardiomyozyten nahe, da die Funktion des gesamten Herzens wesentlicher ist, als die Funktion oder die Morphologie seiner isolierten Zellen. Somit zeigen die Daten dieser Arbeit zwar nicht in allen analysierten Parametern synergistische Effekte eines kombinierten AT<sub>1</sub>- und ET<sub>A</sub>-R-Antagonismus, es finden sich jedoch starke Hinweise für den zusätzlichen Nutzen einer kombinierten Therapie im Vergleich zu den Monotherapien.

## 5 Zusammenfassung

Die Verbesserung der chronischen Herzinsuffizienz in Bezug auf Hämodynamik, Herzgewicht, zelluläre kardiale Hypertrophie und Kontraktilität durch Endothelin-A- und Angiotensin II-Typ 1-Rezeptor-Antagonisten wurde am Modell des infrarenalen, aortokavalen Shunts an Ratten untersucht.

Nach Anlage eines infrarenalen, aortokavalen Shunts erhielten die Tiere entweder eine Therapie mit Vehikel (VEH), mit Darusentan (Endothelin-A-Rezeptor-Antagonist, 50mg/kgKG, DAR), Candesartan (Angiotensin II-Typ 1-Rezeptor-Antagonist, 1mg/kgKG, CAN) oder eine Kombination beider Medikamente mit derselben Dosierung (COM). Sham-operierte Tiere bildeten die Kontrollgruppe (SHAM). Nach vier Wochen erfolgte die Messung hämodynamischer Parameter, eine Blut- und Organentnahme und die Erfassung der Morphologie und der Kontraktionscharakteristika isolierter atrialer und ventrikulärer Kardiomyozyten.

VEH zeigte im Vergleich zu Sham ein erhöhtes relatives Herzgewicht, einen erhöhten LVEDP und ZVD, erniedrigte dP/dt, längere, breitere und voluminösere ventrikuläre Kardiomyozyten und eine abgeschwächte Kontraktionsantwort unter Stimulation mit Isoprenalin und erhöhtem extrazellulärem Kalzium.

Alle drei Therapien reduzierten im Vergleich zu VEH das relative Herzgewicht und den LVEDP. CAN senkte den ZVD und DAR verbesserte die dP/dt im Vergleich zu VEH. COM verbesserte den ZVD und die dP/dt im Vergleich zu VEH und zeigte eine signifikante Senkung des LVEDP im Vergleich zu DAR and CAN.

Alle drei Therapien waren in der Lage, das Zellvolumen ventrikulärer Kardiomyozyten hochsignifikant zu reduzieren. Dabei zeigte DAR signifikant stärkere Effekte als CAN. Alle drei Therapien reduzierten die Zellbreite im Vergleich zu Vehikel-behandelten Zellen. DAR normalisierte die Zellbreite im Vergleich zu SHAM, zeigte aber auf der anderen Seite keine Reduktion der Zelllänge. Nur COM reduzierte die Zelllänge signifikant. Dies resultierte in längeren, dünneren Zellen in der DAR-Gruppe ausgedrückt durch einen erhöhten Quotienten aus Zelllänge zu Zellbreite im Vergleich zu allen anderen Gruppen.

Die atrialen Kardiomyozyten shuntoperierter Tiere zeigten eine Hypertrophie, die in allen Gruppen gleichermaßen ausgeprägt war. Es zeigte sich keine Regression der Hypertrophie unter den drei Therapien.

Kontraktionsanalysen zeigten eine Verbesserung der abgeschwächten Kontraktionsamplitude im Vergleich zu VEH-Werten bei allen drei Therapien unter Isoprenalinstimulation. Unter Stimulation mit erhöhtem extrazellulärem Kalzium normalisierten DAR and CAN den Anstieg der Kontraktionsamplitude im Vergleich zu SHAM und waren gegenüber COM überlegen.

In dieser Arbeit führten die drei gewählten Therapiemaßnahmen zu einer Verbesserung der chronischen Herzinsuffizienz mit Reduktion des Herzgewichtes, einer verbesserten Hämodynamik, Verminderung der zellulären Hypertrophie und einer Verbesserung des zellulären Kontraktionsverhaltens. COM hatte die günstigsten Effekte auf die Hämodynamik. DAR war auf zellulärer Ebene die effektivste Therapie.



## **6 Schlagwörter**

Endothelin, Endothelin Typ-A- Rezeptor, Angiotensin, Angiotensin II- Typ-1- Rezeptor, chronischer Rezeptor- Antagonismus, Herzinsuffizienz, ventrikulär, atrial, Kardiomyozyt, zelluläre Kontraktilität, Ratte, aortokavaler Shunt.

## **7 Keywords**

Endothelin, endothelin type-A receptor, angiotensin, angiotensin II type-1 receptor, chronic receptor antagonism, heart failure, ventricular, atrial, cardiac myocytes, cell contractility, rats, aorto-caval shunt.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Denolin, H., H. Kuhn, et al., *The definition of heart failure*. Eur Heart J, 1983(4(7)): p. 445-8.
2. Remme, W.J. and K. Swedberg, *Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure*. Eur Heart J, 2001(22): p. 1527-60.
3. McKee, P.A., W.P. Castelli, et al., *The natural history of congestive heart failure: The Framingham study*. New Engl J Med, 1971(285): p. 1441-6.
4. Ho, K.K., J.L. Pinsky, et al., *The epidemiology of heart failure: the Framingham study*. J AM Coll Cardiol, 1993(44(4Suppl A)): p. 6A-13A.
5. Berry, C., D.R. Murdoch, and J.J. McMurray, *Economics of chronic heart failure*. Eur J Heart Fail, 2001(3(3)): p. 283-91.
6. Braunwald, E. and M.R. Bristow, *Congestive Heart Failure: Fifty years of progress*. Circulation, 2000(102): p. IV-14-IV-23.
7. Schrier, R.W. and W.T. Abraham, *Hormones and hemodynamics in heart failure*. N Engl J Med, 1999(341(8)): p. 577-85.
8. Cohn, J.N., *Structural basis for heart failure*. Circulation, 1995(91): p. 2504-7.
9. Benedict, C.R., B. Shelton, et al., *Prognostic significance of plasma norepinephrine in patients with asymptomatic left ventricular dysfunction*. Circulation, 1996(94): p. 690-7.
10. Bristow, M.R., R. Ginsburg, et al., *Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts*. N Engl J Med, 1982(307(4)): p. 205-11.
11. De Zeeuw, D., W.M. Janssen, and P.E. de Jong, *Atrial natriuretic factor: its pathophysiological significance in humans*. Kidney Int, 1992(41(5)): p. 1115-33.
12. Willenbrock, R., M. Scheuermann, et al., *Angiotensin inhibition and atrial natriuretic peptide release after acute volume expansion in rats with aortocaval shunt*. Cardiovasc Res, 1999(42): p. 733-42.

13. Scheuermann, M., R. Dietz, and R. Willenbrock, *Acute and chronic neutral endopeptidase inhibition and the natriuretic response to acute volume expansion*. Eur J Pharmacol, 1998(347(2-3)): p. 245-52.
14. Richards, A.M., M.G. Nicholls, et al., *Plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide and adrenomedullin: new neurohumoral predictors of left ventricular function and prognosis after myocardial infarction*. Circulation, 1998(97): p. 1921-9.
15. Tsutamoto, T., A. Wada, et al., *Attenuation of compensation of endogenous cardiac natriuretic peptide system in chronic heart failure*. Circulation, 1997(96): p. 509-16.
16. The S. O. L. V. D. Investigators, *Effect of Enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure*. N Engl J Med, 1991(325(5)): p. 293-302.
17. Pfeffer, M.A., E. Braunwald, et al., *Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction (SAVE)*. N Engl J Med, 1992(327(10)): p. 669-77.
18. The C. O. N. S. E. N. S. U. S. trial study group, *Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure*. N Engl J Med, 1987(316(23)): p. 1429-35.
19. The A. I. R. E. study investigators, *Effect of ramipril on mortality and morbidity of survivors of acute myocardial infarction with clinical evidence of heart failure*. Lancet, 1993(342): p. 821-28.
20. Merit-Hf, S.G., *Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL randomised intervention trial in congestive heart failure (MERIT-HF)*. Lancet, 1999(353): p. 2001-7.
21. Cleland, J., J. McGowan, et al., *The evidence for beta blockers in heart failure*. Bmj, 1999(318): p. 824-5.
22. Cibus-II Investigators and Committees, *The cardiac insufficiency bisoprolol study II (CIBIS-II): a randomised trial*. Lancet, 1999(353): p. 9-13.

23. Pitt, B., F. Zannad, et al., *The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure*. N Engl J Med, 1999(341(10)): p. 709-17.
24. McKelvie, R.S., K.K. Teo, et al., *Effects of exercise training in patients with congestive heart failure: a critical review*. Jacc, 1995(25(3)): p. 789-96.
25. Trohman, R.G., M.H. Kim, and S.L. Pinski, *Cardiac pacing: the state of the art*. Lancet, 2004. **364**(9446): p. 1701-19.
26. Zeltsman, D. and M.A. Acker, *Surgical management of heart failure: an overview*. Annu Rev Med, 2002(53): p. 383-91.
27. The Digitalis Investigation Group, *The effect of digoxin on mortality and morbidity in patients with heart failure*. N Engl J Med, 1997(336(8)): p. 525-33.
28. Coletta, A., S. Thackray, et al., *Clinical trial update: Highlights of the scientific sessions of the american college of cardiology 2002*. Eur J Heart Fail, 2002(4): p. 381-388.
29. Packer, M., R. Califf, et al., *Comparison of omapatrilat and enalapril in patients with chronic heart failure*. Circulation, 2002(106): p. 920-6.
30. Weber, M.A., *Vasopeptidase inhibitors*. Lancet, 2001(358(9292)): p. 1525-32.
31. Greenberg, B., *Treatment of Heart Failure: State of the Art and Perspectives*. J Cardiovasc Pharmacol, 2001(38(Suppl2)): p. S59-S63.
32. Givertz, M.M., *Manipulation of the renin-angiotensin system*. Circulation, 2001(104): p. e14-e18.
33. Brunner-La Rocca, H.P., G. Vaddadi, and M.D. Esler, *Recent insight into therapy of congestive heart failure: focus on ACE inhibition and angiotensin-II antagonism*. J Am Coll Cardiol, 1999(33(5)): p. 1163-73.
34. Unger, T., O. Chung, et al., *Angiotensin receptors*. J Hypertens Suppl, 1996(14(5)): p. S95-S103.
35. Unger, T., *Neurohumoral modulation in cardiovascular disease*. Am Heart J, 2000(139): p. S2-S8.

36. Lorell, B.H., *Role of angiotensin AT1 and AT2 receptors in cardiac hypertrophy and disease*. Am J Cardiol, 1999(83): p. 48H-52H.
37. Siragy, H.M., *The role of the AT2 receptor in hypertension*. Am J Hypertens, 2000(13): p. 62S-67S.
38. Gross, V., T. Walther, et al., *Left ventricular function in mice lacking the AT2 receptor*. J Hypertens, 2001(19): p. 967-76.
39. Opie, L.H. and M.N. Sack, *Enhanced angiotensin II activity in heart failure: reevaluation of the counterregulatory hypothesis of receptor subtypes*. Circ Res, 2001(88(7)): p. 654-8.
40. Matsubara, H., *Pathophysiological role of angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular and renal diseases*. Circulation Research, 1998(83(12)): p. 1182-91.
41. Senbonmatsu, T., S. Ichihara, et al., *Evidence for angiotensin II type 2 receptor-mediated cardiac myocyte enlargement during in vivo pressure overload*. J Clin Invest, 2000(106(3)): p. R25-9.
42. Akishita, M., M. Iwai, et al., *Inhibitory Effects of Angiotensin II type 2 receptor on coronary arterial remodeling after aortic banding in mice*. Circulation, 2000(102): p. 1684-89.
43. Xia, Q.G., O. Chung, et al., *Significance of timing of angiotensin AT1 receptor blockade in rats with myocardial infarction-induced heart failure*. Cardiovasc Res, 2001(49): p. 110-17.
44. Liu, Y.H., X.P. Yang, et al., *Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and Angiotensin II type 1 receptor antagonists in rats with heart failure*. J Clin Invest, 1997(99(8)): p. 1926-1935.
45. Richer, C., P. Fornes, et al., *Effects of long-term angiotensin II AT1 receptor blockade on survival, hemodynamics and cardiac remodeling in chronic heart failure in rats*. Cardiovasc Res, 1999(41(1)): p. 100-8.
46. Linz, W., H. Heitsch, et al., *Long-term angiotensin II type 1 receptor blockade with fonsartan doubles lifespan of hypertensive rats*. Hypertension, 2000(35(4)): p. 908-13.

47. Milavetz, J.J., T.E. Raya, et al., *Survival after myocardial infarction in rats: captopril versus losartan*. J Am Coll Cardiol, 1996(27(3)): p. 714-9.
48. Devereux, R.B., *Therapeutic options in minimizing left ventricular hypertrophy*. Am Heart J, 2000(139): p. S9-S14.
49. Julius, S., *Long-term potential of angiotensin receptor blockade for cardiovascular protection in hypertension: The VALUE trial*. Cardiology, 1999(91(Suppl 1)): p. 8-13.
50. Weber, M.A., *Comparison of type 1 angiotensin II receptor blockers and angiotensin converting enzyme inhibitors in the treatment of hypertension*. J Hypertens, 1997(15(Suppl 6)): p. S31-S36.
51. Riegger, G.A., H. Bouzo, et al., *Improvement in exercise tolerance and symptoms of congestive heart failure during treatment with candesartan cilexetil*. Circulation, 1999(100): p. 2224-30.
52. Gottlieb, S.S., K. Dickstein, et al., *Hemodynamic and neurohumoral effects of the angiotensin II antagonist losartan in patients with congestive heart failure*. Circulation, 1993(88(4 Pt. 1)): p. 1602-9.
53. Havranek, E.P., I. Thomas, et al., *Dose-related beneficial long-term hemodynamic and clinical efficacy of irbesartan in heart failure*. J Am Coll Cardiol, 1999(33(5)): p. 1174-81.
54. Lijnen, P. and V. Petrov, *Induction of cardiac fibrosis by aldosterone*. J Mol Cell Cardiol, 2000(32): p. 865-879.
55. Rossi, G.P., M. Cavallin, et al., *The endothelin-aldosterone axis and cardiovascular diseases*. J Cardiovasc Pharmacol, 2001(38(Suppl2)): p. S49-S52.
56. Baan, J.J., *AT1-receptor antagonists for the treatment of chronic heart failure*. Cardiovasc Res, 1999(41): p. 14-15.
57. Pitt, B., P.A. Poole-Wilson, et al., *Effect of losartan compared with captopril on mortality in patients with symptomatic heart failure: randomised trial - the Losartan Heart Failure Survival Study ELITE II*. Lancet, 2000(355): p. 1582-7.

58. Dickstein, K. and J. Kjekshus, *Effects of Losartan and captopril on mortality and morbidity in high-risk patients after acute myocardial infarction: The OPTIMAAL randomised trial*. Lancet, 2002(360): p. 752-60.
59. Pfeffer, M.A., J.J. McMurray, et al., *Valsartan, captopril, or both in myocardial infarction complicated by heart failure, left ventricular dysfunction, or both*. N Engl J Med, 2003. **349**(20): p. 1893-906.
60. Pfeffer, M.A., K. Swedberg, et al., *Effects of candesartan on mortality and morbidity in patients with chronic heart failure: the CHARM-Overall programme*. Lancet, 2003. **362**(9386): p. 759-66.
61. McMurray, J.J., J. Ostergren, et al., *Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and reduced left-ventricular systolic function taking angiotensin-converting-enzyme inhibitors: the CHARM-Added trial*. Lancet, 2003. **362**(9386): p. 767-71.
62. Granger, C.B., J.J. McMurray, et al., *Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and reduced left-ventricular systolic function intolerant to angiotensin-converting-enzyme inhibitors: the CHARM-Alternative trial*. Lancet, 2003. **362**(9386): p. 772-6.
63. Yusuf, S., M.A. Pfeffer, et al., *Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and preserved left-ventricular ejection fraction: the CHARM-Preserved Trial*. Lancet, 2003. **362**(9386): p. 777-81.
64. Jong, P., C. Demers, et al., *Angiotensin receptor blockers in heart failure: meta-analysis of randomized controlled trials*. J Am Coll Cardiol, 2002(39(3)): p. 463-70.
65. Maggioni, A.P., I. Anand, et al., *Effects of valsartan on morbidity and mortality in patients with heart failure not receiving angiotensin-converting enzyme inhibitors*. J Am Coll Cardiol, 2002(40): p. 1414-21.
66. Yanagisawa, M., H. Kurihara, et al., *A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells*. Nature, 1988(332(6163)): p. 411-5.
67. Nambi, P., M. Clozel, and G. Feuerstein, *Endothelin and heart failure*. Heart Fail Rev, 2001(6): p. 335-340.

68. Krum, H., R. Denver, et al., *Diagnostic and therapeutic potential of the endothelin system in patients with chronic heart failure*. *Heart Fail Rev*, 2001(6): p. 341-352.
69. Levin, E.R., *Endothelins*. *N Eng J Med*, 1995(333(6)): p. 356-63.
70. McMurray, J., S. Ray, et al., *Plasma endothelin in chronic heart failure*. *Circulation*, 1992(85): p. 1374-1379.
71. Omland, T., R. Lie, et al., *Plasma endothelin determination as a prognostic indicator of 1 year mortality after acute myocardial infarction*. *Circulation*, 1994(89): p. 1573-9.
72. Mulder, P., V. Richard, et al., *Role of endogenous endothelin in chronic heart failure*. *Circulation*, 1997(96): p. 1976-82.
73. Wada, A., T. Tsutomoto, et al., *Comparison of the effects of selective endothelin ETA and ETB receptor antagonists in congestive heart failure*. *J Am Coll Cardiol*, 1997(30(5)): p. 1385-92.
74. Sakai, S., T. Miyauchi, et al., *Inhibition of myocardial endothelin pathway improves long-term survival in heart failure*. *Nature*, 1996(384(6607)): p. 353-5.
75. Rubin, L.J., D.B. Badesch, et al., *Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension*. *N Engl J Med*, 2002. **346**(12): p. 896-903.
76. Humbert, M., O. Sitbon, and G. Simonneau, *Treatment of pulmonary arterial hypertension*. *N Engl J Med*, 2004. **351**(14): p. 1425-36.
77. Myland, P. and J.G. Cleland, *Update of REACH-1 and MERIT-HF clinical trials in heart failure*. *Eur J Heart Fail*, 1999(1(2)): p. 197-200.
78. Stiefelhagen, P., *Neue Studienergebnisse aus der Kardiologie*. *Internist*, 2002(43): p. 902-905.
79. Kalra, P.R., J.C. Moon, and A.J. Coats, *Do results of the ENABLE (Endothelin antagonist bosentan for lowering cardiac events in heart failure) study spell the end for non-selective endothelin antagonism in heart failure*. *Int J Cardiol*, 2002(85): p. 195-197.
80. Lüscher, T.F., F. Enseleit, and et al., *Hemodynamic and neurohumoral effects of selective endothelin A (ET(A)) receptor blockade in chronic*



- heart failure: the Heart Failure ET(A) Receptor Blockade Trial (HEAT).* Circulation, 2002(106(21)): p. 2666-72.
81. Huang, M., M.H. LeBlanc, and R.L. Hester, *Evaluation of the needle technique for producing an arteriovenous fistula.* J Appl Physiol, 1994(77(6)): p. 2907-11.
  82. Garcia, R. and S. Diebold, *Simple, rapid, and effective method of producing aortocaval shunts in the rat.* Cardiovasc Res, 1990(24(5)): p. 430-2.
  83. Harding, S.E., G. Vescovo, et al., *Contractile response of isolated adult rat and rabbit cardiac myocytes to isoproterenol and calcium.* J Mol Cell Cardiol, 1988(20(7)): p. 635-47.
  84. Sarsero, D., P. Molenaar, et al., *Putative beta 4-adrenoceptors in rat ventricle mediate increases in contractile force and cell Ca<sup>2+</sup>: comparison with atrial receptors and relationship to (-)- 3H -CGP 12177 binding.* Br J Pharmacol, 1999(128(7)): p. 1445-60.
  85. Freestone, N.S., S. Ribaric, et al., *Differential lusitropic responsiveness to beta-adrenergic stimulation in rat atrial and ventricular cardiac myocytes.* Eur J Physiol, 2000(441): p. 78-87.
  86. Isenberg, G. and U. Klockner, *Calcium tolerant ventricular myocytes prepared by preincubation in a "KB Medium".* Pflügers Arch, 1982(395): p. 6-18.
  87. Stein, B., W. Schmitz, et al., *Pharmacological characterization of A<sub>2</sub>-adenosine receptors in guinea-pig ventricular cardiomyocytes.* J Mol Cell Cardiol, 1994(26(3)): p. 403-14.
  88. Gutkowska, J., R. Bonan, et al., *Atrial natriuretic factor in human plasma.* Biochem Biophys Res Commun, 1986. **139**(1): p. 287-95.
  89. Richman, R.A., G.S. Kopf, et al., *Preparation of cyclic nucleotide antisera with thyroglobulin-cyclic nucleotide conjugates.* J Cyclic Nucleotide Res, 1980. **6**(6): p. 461-8.
  90. Gleiter, C.H. and K.E. Morike, *Clinical pharmacokinetics of candesartan.* Clin Pharmacokinet, 2002(41(1)): p. 7-17.

91. Kirch, W., B. Horn, and J. Schweizer, *Comparison of angiotensin II receptor antagonists*. Eur J Clin Inv, 2001(31): p. 698-706.
92. Bagnall, A. and D. Webb, *Are selektive endothelin A receptor antagonists better than mixed antagonists?* J Cardiovasc Pharmacol, 2001(38(Suppl2)): p. S43-S46.
93. Liu, Z., D.R. Hilbelink, et al., *Regional changes in hemodynamics and cardiac myocyte size in rats with aortocaval fistulas*. Circ Res, 1991(69): p. 52-8.
94. Willenbrock, R., M. Scheuermann, et al., *Acute and chronic neutral endopeptidase inhibition in rats with aortocaval shunt*. Hypertension, 1996(27(6)): p. 1259-66.
95. Scheuermann-Freestone, M., N.S. Freestone, et al., *A new model of congestive heart failure in the mouse due to chronic volume overload*. Eur J Heart Fail, 2001(3): p. 535-43.
96. Gerdes, A.M., S.E. Campbell, and D.R. Hilbelink, *Structural Remodeling of Cardiac Myocytes in Rats with Arteriovenous Fistulas*. Lab Invest, 1988(59(6)): p. 857-61.
97. Wang, X., F. Li, and A.M. Gerdes, *Chronic Pressure Overload Cardiac Hypertrophy and Failure in Guinea Pigs: I. Regional Hemodynamics and Myocyte Remodeling*. J Moll Cell Cardiol, 1999(31): p. 307-17.
98. Kajstura, J., X. Zhang, et al., *The cellular basis of pacing-induced dilated Cardiomyopathy*. Circulation, 1995(92): p. 2306-2317.
99. Anversa, P., C. Beghi, et al., *Myocardial infarction in rats. Infarct size, myocyte hypertrophy, and capillary growth*. Circ Res, 1986(58(1)): p. 26-37.
100. Harding, S.E., S.M. Jones, et al., *Isolated ventricular myocytes from failing and non-failing human heart; the relation of age and clinical status of patients to isoproterenol response*. J Mol Cell Cardiol, 1992(24): p. 549-564.

101. del Monte, F., P. O'Gara, et al., *Cell geometry and contractile abnormalities of myocytes from failing human left ventricle*. Cardiovasc Res, 1995(30): p. 281-90.
102. Qing, G. and R. Garcia, *Chronic captopril and losartan administration in rats with high-output heart failure*. Am J Physiol, 1992(263(3 Pt 2)): p. H833-40.
103. Schieffer, B., A. Wirger, et al., *Comparative effects of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor blockade on cardiac remodeling after myocardial infarction in the rat*. Circulation, 1994(89(5)): p. 2273-82.
104. Loennechen, J.P., U. Wisloff, et al., *Effects of cariporide and losartan on hypertrophy, calcium transients, contractility, and gene expression in congestive heart failure*. Circulation, 2002(105): p. 1380-86.
105. Ambrose, J., D.G. Pribnow, et al., *Angiotensin type 1 receptor antagonism with irbesartan inhibits ventricular hypertrophy and improves diastolic function in the remodeling post-myocardial infarction ventricle*. J Cardiovasc Pharmacol, 1999(33(3)): p. 433-9.
106. Raya, T.E., S.J. Fonken, et al., *Hemodynamic effects of direct angiotensin II blockade compared to converting enzyme inhibition in rat model of heart failure*. Am J Hypertens, 1991(4(4 Pt. 2)): p. 334S-340S.
107. Sakata, Y., T. Masuyama, et al., *Renin angiotensin system-dependent hypertrophy as a contributor to heart failure in hypertensive rats: different characteristics from renin angiotensin system-independent hypertrophy*. J Am Coll Cardiol, 2001. **37**(1): p. 293-9.
108. Ding, S.S., C. Qiu, et al., *Chronic endothelin receptor blockade prevents renal vasoconstriction and sodium retention in rats with chronic heart failure*. Cardiovasc Res, 2002(53): p. 963-70.
109. Yamauchi-Kohno, R., T. Miyauchi, et al., *Role of endothelin in deterioration of heart failure due to cardiomyopathy in hamsters*. Circulation, 1999(99): p. 2171-2176.
110. Mishima, T., M. Tanimura, et al., *Effects of long-term therapy with bosentan on the progression of left ventricular dysfunction and*

- remodeling in dogs with heart failure. J Am Coll Cardiol, 2000(35(1)): p. 222-9.*
111. Oie, E., R. Bjonerheim, et al., *ET-receptor antagonism, myocardial gene expression, and ventricular remodeling during CHF in rats. Am J Physiol, 1998(275): p. H868-77.*
  112. Fraccarollo, D., J. Bauersachs, et al., *Cardioprotection by long-term ET(A) receptor blockade and ACE inhibition in rats with congestive heart failure: mono- versus combination therapy. Cardiovasc Res, 2002. 54(1): p. 85-94.*
  113. Hu, K., P. Gaudron, et al., *Aggravation of left ventricular remodeling by a novel specific endothelin ETA antagonist EMD94246 in rats with experimental myocardial infarction. J Cardiovasc Pharmacol, 1998(32): p. 505-8.*
  114. Philipp, S., J. Monti, et al., *Treatment with darusentan over 21 days improved cGMP generation in patients with chronic heart failure. Clin Sci(Lond), 2002(103 Suppl 48): p. 249S-253S.*
  115. Cavasin, M.A., O.A. Carretero, et al., *Long-term effects of selective and nonselective endothelin receptor antagonists in mice with heart failure. J Card Fail, 2002(8(4)): p. 254-61.*
  116. Saad, D., R. Mukherjee, et al., *The effects of endothelin-A receptor blockade during the progression of pacing-induced heart failure. J Am Coll Cardiol, 1998(32(6)): p. 1779-86.*
  117. Gerdes, A.M., S.E. Kellerman, et al., *Structural remodeling of cardiac myocytes in patients with ischemic cardiomyopathy. Circulation, 1992(86): p. 426-30.*
  118. Gerdes, A.M. and J.M. Capasso, *Structural remodeling and mechanical dysfunction of cardiac myocytes in heart failure. J Mol Cell Cardiol, 1995(27(3)): p. 849-56.*
  119. Brent New, R., A.C. Sampson, et al., *Effects of combined angiotensin II and Endothelin receptor blockade with developing heart failure. Circulation, 2000(102): p. 1447-53.*

120. Clerk, A. and P.H. Sugden, *Activation of protein kinase cascades in the heart by hypertrophic G protein-coupled receptor agonists*. Am J Cardiol, 1999(83): p. 64H-69H.
121. Yamazaki, T., I. Komuro, and Y. Yazaki, *Role of the renin-angiotensin system in cardiac hypertrophy*. Am J Cardiol, 1999(83): p. 53H-57H.
122. Yamazaki, T., I. Komuro, and Y. Yazaki, *Molecular aspects of mechanical stress-induced cardiac hypertrophy*. Mol Cell Biochem, 1996(163-164): p. 197-201.
123. Yamazaki, T., I. Komuro, et al., *Endothelin-1 is involved in mechanical stress-induced cardiomyocyte hypertrophy*. J Biol Chem, 1996(271(6)): p. 3221-28.
124. Morimoto, T., K. Hasegawa, et al., *Calcineurin-GATA4 pathway is involved in beta-adrenergic agonist-responsive endothelin-1 transcription in cardiac myocytes*. J Biol Chem, 2001(276(37)): p. 34983-9.
125. Ishigai, Y., T. Mori, et al., *Role of bradykinin-NO pathway in prevention of cardiac hypertrophy by ACE inhibitor in rat cardiomyocytes*. Am J Physiol, 1997(273): p. H2659-63.
126. Heineke, J., T. Kempf, et al., *Downregulation of cytoskeletal muscle LIM protein by nitric oxide*. Circulation, 2003(107): p. 1424-32.

## 9 Abkürzungsverzeichnis

° C	Grad Celsius
dP/dt	die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit
ACE	Angiotensin-Konversionsenzym
Ald.	Aldosteron
Ang II	Angiotensin II
ANP	Atrial natriuretic peptide
AT	Angiotensin-Rezeptor
AT <sub>1</sub> -, AT <sub>2</sub> -, AT <sub>3</sub> -, AT <sub>4</sub> - R	Angiotensin II-Typ 1-, Typ 2-, Typ 3-, Typ 4-Rezeptor
AT <sub>1</sub> -R- Antagonist	Angiotensin II-Typ 1-Rezeptor-Antagonist
Baseline	Baseline-Bedingung am Ende der Äquilibrationsphase
BD diast.	Systemischer arterieller diastolischer Blutdruck
BD syst.	Systemischer arterieller systolischer Blutdruck
BNP	Brain natriuretic peptide
Ca <sup>2+</sup>	Ionisiertes Kalzium
Candesartan- Gruppe	Eine mit Candesartan therapierte Gruppe shuntoperierter Tiere
cGMP	Zyklisches Guaninmonophosphat
CHI	Chronische Herzinsuffizienz
Darusentan- Gruppe	Eine mit Darusentan therapierte Gruppe shuntoperierter Tiere
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DG	Diazylglyzerin
Dualtherapie- Gruppe	Eine mit Darusentan und Candesartan therapierte Gruppe shuntoperierter Tiere

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	Die extrazelluläre Signal-regulierte Protein Kinase
ET	Endothelin
et al.	und Mitarbeiter
ET-R	Endothelin-Rezeptoren
ET-R-Antagonist	Endothelin-Rezeptor-Antagonisten
ET <sub>A</sub> -R	Endothelin-Typ A-Rezeptor
ET <sub>A</sub> -R-Antagonist	Selektiver Endothelin-Typ A-Rezeptor-Antagonist
ET <sub>A/B</sub> -R-Antagonist	Unselektiver Endothelin-Rezeptor-Antagonist
ET <sub>B</sub> -R	Endothelin-Typ B-Rezeptor
ET <sub>B</sub> -R-Antagonist	Selektiver Endothelin-Typ B-Rezeptor-Antagonist
h	Stunde
HF	Herzfrequenz
HTx	Herztransplantation
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
Iso 5nM	Stimulation mit einer 5 nanomolaren Isoprenalinkonzentration
Iso 10 nM	Stimulation mit einer 10 nanomolaren Isoprenalinkonzentration
Iso 50 nM	Stimulation mit einer 50 nanomolaren Isoprenalinkonzentration
KG	Körpergewicht
KHK	Koronarer Herzerkrankung
Kontroll-Gruppe	Scheinoperierte Kontrollgruppe
LVEDP	linksventrikulärer enddiastolischer Druck
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase

MAP	Systemischer arterieller mittlerer Blutdruck
Max. Ca.	Stimulation unter erhöhtem extrazellulärem Kalzium
MCSA	Myocyte-Cross-Sectional-Area
mmol / l	Mikromol pro Liter
NA	Noradrenalin
Na <sup>+</sup>	Ionisiertes Natrium
nmol / l	Nanomol pro Liter
NO	Stickoxid
NP	Natriuretische Peptide
NP-A, -B, -C	Natriuretische Peptid- Rezeptoren Typ A, B und C
NYHA	New York Heart Association
PE-50	Polyethylen-Katheter
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
pmol / l	Pikomol pro Liter
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RIA	Radioimmunoassay
RVEDP	rechtsventrikulärer enddiastolischer Druck
SEM	Standardfehler
SNS	sympathisches Nervensystem
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$
V <sub>1</sub> -R, V <sub>2</sub> -R	Vasopressin-Rezeptoren
Vehikel-Gruppe	Eine mit Vehikel therapierte Gruppe shuntoperierter Tiere
vs.	Versus
z.B.	Zum Beispiel
ZVD	Zentralvenöser Druck



## **10 Danksagung**

Mein herzlicher Dank gilt allen Mitarbeitern des Labors für experimentelle und klinische Herzinsuffizienz für ihre Unterweisung und ihre Anleitung bei den labortechnischen Methoden und der Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Willenbrock für die Planung und Unterstützung meiner Projekte, Frau Dr. Michaela Scheuermann-Freestone und Herrn Dr. Nicholas Simon Freestone für die Hilfe zur Etablierung der Methoden und Frau Astrid Schiche, Frau Rita Günzel und Dr. Ines Pagel für die Hilfe der Durchführung der Therapieversuche.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern und meiner Frau Maria del Carmen für ihre Geduld und ihre Unterstützung in allen Belangen danken.

## **11 Curriculum Vitae**

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

## **12 Eidesstattliche Erklärung**

„Ich, Aarne Erik Feldheiser, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Effekte des Antagonismus von Endothelin- und Angiotensin- Rezeptoren auf Kardiomyozyten bei experimenteller Herzinsuffizienz“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Aarne Erik Feldheiser