

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR
INNERE MEDIZIN II (KARDIOLOGIE, NEPHROLOGIE, PNEUMOLOGIE,
INTERNALISTISCHE INTENSIVMEDIZIN)
PROFESSOR DR. GÜNTER RIEGGER

DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Expression von IL-6 und BNP bei Herzinsuffizienz und Beeinflussung
durch Omapatrilat (Vasopeptidase-Inhibitor)

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Tobias Götz

2008

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Weber
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Andreas Luchner
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Frank Schweda
Tag der mündlichen Prüfung: 06.07.2009

G L I E D E R U N G

<u>1</u>	<u>Einleitung</u>	<u>Seite</u>
1.1	Definition der Herzinsuffizienz	5
1.2	Klassifikation der Herzinsuffizienz	5
1.3	Epidemiologie der Herzinsuffizienz	6
1.4	Ätiologie der Herzinsuffizienz	6
1.5	Pathophysiologie der Herzinsuffizienz	7
1.6	Natriuretische Peptide	10
1.7	IL-6	14
1.8	Vasopeptidase-Inhibitoren	15
<u>2</u>	<u>Material und Methoden</u>	
2.1	Versuchstiere	17
2.2	Schrittmacherimplantation	17
2.3	Klinische Untersuchungen	
2.3.1	Transthorakale Echokardiographie	18
2.3.2	Hämodynamische Messungen	18
2.3.3	Berechnung der linksventrikulären Wandspannung	19
2.4	Versuchsaufbau	19
2.5	RNA-Extraktion	
2.5.1	Vorbereitung	20
2.5.2	Homogenisierung	20
2.5.3	Reinigung	20
2.5.4	Eluation und Präzipitation	21
2.5.5	Determination	21
2.6	Transskription in cDNA	22
2.7	Realtime PCR mit Light Cycler	22
2.8	Statistische Auswertung	23

3 Ergebnisse

3.1	Blutdruck	24
3.2	Echokardiographie	
3.2.1	Linksventrikuläre Verkürzungsfaktion	26
3.2.2.	Linksventrikuläre systolische Wandspannung	28
3.2.3	Linksventrikuläre enddiastolischer Diameter	29
3.2.4	Linksventrikulärer posteriorer Wanddurchmesser	31
3.3	Urinausscheidung und Na/K – Exkretion	
3.3.1	Natrium	
3.3.1.1	Natriumkonzentration im Urin	32
3.3.1.2	24h-Natrium-Exkretion	33
3.3.2	Kaliumausscheidung	
3.3.2.1	Kaliumkonzentration im Urin	35
3.3.2.2	24h-Kalium-Exkretion	36
3.3.3	Urinvolumen / Bilanz	
3.3.3.1	Urinausscheidung	38
3.3.3.2	Trinkmenge	39
3.3.3.3	Bilanz	41
3.4	Gewicht	
3.4.1	Körpergewicht	42
3.4.2	Linksventrikuläres Gewicht	43
3.4.3	Masseindex	45
3.4.4	Verlauf des Körpergewichtes der einzelnen Tiere	47
3.5	BNP-Expression	49
3.6	IL-6 – Expression	50

4 Diskussion

4.1	BNP	53
4.2	L-6	55
4.3	Vasopeptidase-Inhibitoren	56

5. Zusammenfassung

59

<u>6.</u>	<u>Limitationen</u>	60
<u>7.</u>	<u>Danksagung</u>	60
<u>8.</u>	<u>Lebenslauf</u>	61
<u>9.</u>	<u>Literaturverzeichnis</u>	63

1. Einleitung

1.1 Definition der Herzinsuffizienz

Unter Herzinsuffizienz versteht man die Unfähigkeit des Herzens, bei normalem enddiastolischem Füllungsdruck ein adäquates Herzzeitvolumen aufrecht zu erhalten.

Aus diesem Pumpversagen resultiert eine Unterversorgung des Organismus mit Sauerstoff und Nährstoffen. Von der World Health Organisation (WHO) wird die Herzinsuffizienz als verminderte körperliche Belastbarkeit aufgrund einer ventrikulären Funktionsstörung definiert.

Die Einteilung der Herzinsuffizienz erfolgt nach zeitlichem Verlauf (akut / chronisch), nach der Lokalisation (Rechtsherzinsuffizienz / Linksherzinsuffizienz / Globalinsuffizienz) oder nach der primären hämodynamischen Störung (Vorwärtsversagen / Rückwärtsversagen).

Abhängig von der Lokalisation der Herzinsuffizienz kommt es im Sinne eines Rückwärtsversagens zum Rückstau des Blutes mit entsprechenden Stauungszeichen wie Halsvenenstauung, Anasarka, Pleuraerguß, Aszites und Hepatomegalie bei Rechtsherzinsuffizienz, oder zu Lungenödem, Asthma kardiale und Husten bei Linksherzinsuffizienz. Unter Vorwärtsversagen versteht man die Unfähigkeit des Herzmuskels, das Blut in ausreichender Menge in den Körperkreislauf zu fördern.

Bei den meisten Patienten stellt die Herzinsuffizienz eine progressive Erkrankung dar, im Verlauf der Zeit nimmt die Pumpleistung immer stärker ab und die Ernsthaftigkeit der Symptome immer stärker zu (2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 34).

1.2 Klassifikation der Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz wird nach der New York Heart Association (NYHA) in 4 Stadien unterteilt (2, 4, 8, 22, 34):

- NYHA I: Herzkrankheit ohne Beschwerden bei normaler körperlicher Belastung
- NYHA II: Beschwerden bei starker körperlicher Belastung, Beschwerdefreiheit in Ruhe oder bei leichter Belastung
- NYHA III: Beschwerden bei leichter körperlicher Belastung, Beschwerdefreiheit nur in Ruhe
- NYHA IV: Beschwerden auch in Ruhe

1.3 Epidemiologie der Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz hat in den letzten Dekaden an Bedeutung zugenommen. Die Inzidenz der Herzinsuffizienz wird in verschiedenen Studien unterschiedlich gewertet. Unbestritten ist, dass mit zunehmendem Alter die Inzidenz deutlich ansteigt, und ebenso, dass Männer häufiger betroffen sind als Frauen (1, 2, 4, 6, 9, 14). Nach den Angaben der Framingham-Studie liegt die jährliche Inzidenz für Männer jeden Alters bei 2,3 % beziehungsweise für Frauen jeden Alters bei 1,4 %. Dabei sind in der Gruppe der 50 bis 59 jährigen 3% bzw. 2% betroffen, in der Gruppe der 80 bis 89 jährigen dagegen 27% bzw. 22%.

Die Prävalenz beträgt nach der Framingham-Studie bei Männern beziehungsweise Frauen jeden Alters 7,4% bzw. 7,7%, unter den 50 bis 59 jährigen beider Geschlechter 8%, unter den 80 bis 89 jährigen 68% bei Männern und 79% bei Frauen. Dabei ist der im Gegensatz zur Inzidenz erhöhte Anteil der Frauen an der Prävalenz auf die schlechtere Prognose, also die höhere Mortalität der Erkrankung für Männer zurückzuführen (2).

Insgesamt sind in Deutschland ca. 340000-1,7 Mio. Menschen betroffen (8).

1.4 Ätiologie der Herzinsuffizienz

Die Ursachen sind vielfältig, so kann einer akuten Herzinsuffizienz eine systolische Ventrikelfunktionsstörung wie ein myokardiales Pumpversagen, z.B. nach Herzinfarkt oder Myokarditis, zugrunde liegen. Ebenso können akut auftretende Insuffizienz- oder Shuntvitien wie ein Ventrikelseptumdefekt, ein Papillarmuskelabriß nach Herzinfarkt oder akute Klappenvitien nach bakterieller Endokarditis eine systolische Ventrikelfunktionsstörung und somit eine akute Herzinsuffizienz auslösen.

Des Weiteren können Störungen der diastolischen Ventrikelfunktion wie eine mechanische Behinderung der Ventrikelfüllung z.B. durch Perikardtamponade oder auch Herzrhythmusstörungen ein Pumpversagen bewirken. (8)

Auch die Ursachen der chronischen Herzinsuffizienz sind multiätiologisch.

Als die beiden häufigsten Ursachen der Herzinsuffizienz gelten die koronare Herzkrankheit und die arterielle Hypertonie. Daneben können auch Herzklappenvitien, Vorhofflimmern, nutritiv-toxische Kardiomyopathie, Cor pulmonale, Endokarditis und Myokarditis zu einer chronischen Herzinsuffizienz führen. Bis zu 34% der Herzinsuffizienzen sind unbekannter Ätiologie und werden als idiopathische Kardiomyopathie bezeichnet (1, 2, 6, 7, 9, 12, 13, 14, 22, 34).

1.5 Pathophysiologie der Herzinsuffizienz

Die kardiale Pumpleistung hängt vom Zusammenspiel mehrerer Faktoren wie der Vorlast, der Kontraktilität, der Nachlast und der Herzfrequenz ab.

Die Vorlast ist gleichbedeutend mit der diastolischen Füllung der Herzkammern, die den enddiastolischen Ventrikeldruck und somit die Dehnung der Herzmuskelfasern bedingt. Mit einer Steigung der Vorlast und somit einer Steigerung des enddiastolischen Ventrikeldruckes steigt durch den Frank-Starling-Mechanismus (Kraft-Spannungs-Beziehung) auch das Schlagvolumen und die Kontraktilität. Bei übermäßiger enddiastolischer Ventrikelfüllung, wie zum Beispiel bei einem durch Herzinsuffizienz bedingtem Vorwärtsversagen, verliert dieser Regulationsmechanismus aufgrund einer Überdehnung der kardialen Myofibrillen seine Wirksamkeit, die Kontraktilität und somit das Schlagvolumen kann nicht weiter gesteigert werden.

Die Kontraktilität unterliegt einigen regulativen Einflüssen.

Zum einen wird durch den oben erwähnten Frank-Starling-Mechanismus die Effizienz des Herzmuskels durch eine optimale Dehnung der Sarkomere an die Vorlast angepasst. Bei steigender Vorlast und somit bedingt steigender Dehnung der Sarkomere wird die Kontraktilität und das Schlagvolumen dem zu fördernden Volumen angepasst.

Zum anderen kommt es durch den Bowditch-Effekt bei einem Anstieg der Herzfrequenz zu einer Steigerung der Kontraktilität. Dieser auch als Treppenphänomen bezeichnete Mechanismus funktioniert ebenfalls nur innerhalb eines gewissen physiologischen Rahmens, am insuffizienten Herzmuskel ist dieser Effekt nicht mehr wirksam.

Auch das autonome Nervensystem hat starken Einfluss auf die Kontraktilität. Über Barorezeptoren im Karotissinus, Aortenbogen und renalen Arteriolen, sowie über Dehnungsrezeptoren in beiden Vorhöfen und der linken Herzkammer wird die Freisetzung verschiedener Neurohormone reguliert. Erhöhte Spiegel können bei neurohumoralen Faktoren wie Noradrenalin, dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), Endothelin-1, Interleukin-6 (IL-6), Tumornekrosefaktor α (TNF α), antidiuretisches Hormon (ADH), Cardiotrophin-1 (CT-1) und bei natriuretischen Peptiden nachgewiesen werden (24, 34, 42, 45). So kommt es bei einem Abfall des Blutdruckes zur Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) und zur Freisetzung von antidiuretischem Hormon (ADH). Beide Systeme vermindern die renale Ausscheidung und erhöhen somit das intravasale

Volumen. Angiotensin II ist außerdem der stärkste Vasokonstriktor neben Endothelin, wirkt direkt positiv inotrop und durstanregend (24, 26, 34).

Bei erhöhtem enddiastolischem Druck im Herzen werden natriuretische Peptide wie ANP und BNP von Kardiozyten, sowie CNP vom Endothel freigesetzt. Dieses System der natriuretischen Peptide stellt den Gegenspieler des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, des Endothelins und des sympathischen Nervensystems dar (40, 70).

Sensorische Signale der Barorezeptoren beeinflussen ebenfalls über zentrale und periphere Effektorsysteme das Zusammenspiel von Sympathikus und Parasympathikus. Bei einem Überwiegen des Sympathikus wirkt Noradrenalin als Transmitter an den kardialen β_1 -Rezeptoren positiv inotrop, positiv chronotrop, positiv dromotrop und positiv bathmotrop, ein Überwiegen des Parasympathikus dagegen wirkt negativ chronotrop und negativ dromotrop. Auf die Inotropie hat der Parasympathikus wegen fehlender Versorgung der Herzkammern keinen nennenswerten direkten Einfluss.

Im Blut frei zirkulierende Katecholamine aus der Nebennierenrinde wirken ebenfalls an den kardialen Rezeptoren, sowie an vaskulären Rezeptoren der Widerstandsgefäße, wodurch die Nachlast beeinflusst wird.

Die Nachlast, also der Widerstand, gegen den die linke Herzkammer das Blut in den Körperkreislauf pumpt, wird vom mittleren Aortendruck repräsentiert und vor allem durch den peripheren Widerstand stark beeinflusst. Die Belastungssteigerung des linken Ventrikels bei erhöhter Nachlast wird durch das Laplace-Gesetz beschrieben. Dieses Gesetz besagt, dass sich die ventrikuläre Wandspannung proportional zum transmuralen Druck und somit zum Innendruck sowie zum Radius der Kammer, indirekt proportional dagegen zur Dicke der Ventrikelwand verhält. Das bedeutet, dass mit zunehmender Nachlast, mit zunehmender Dilatation und mit abnehmender Dicke der Ventrikelwand die ventrikuläre Spannung und somit die kardiale Belastung steigt (8, 26, 32, 34).

Wie die systolische Ventrikelfunktion wird auch die Diastole von mehreren Parametern beeinflusst. So ist sie abhängig vom Druckverhältnis zwischen Vorhof und Kammer und wird durch erhöhte Steifigkeit der Ventrikelwand gemindert. Auch bei Vorhofflimmern ist die diastolische Füllung der Ventrikel deutlich gemindert (8, 26, 34).

Der Anteil der diastolisch bedingten Herzinsuffizienzen ist derzeit noch nicht genau bekannt, die Prävalenz der definitiven Herzinsuffizienzen mit echokardiographisch nachgewiesen normaler Ejektionsfraktion wird aber mit 41 % beziffert (35).

Kommt es bei einem oder mehreren der genannten Faktoren zu einer Störung, so ist das Herz in seiner Funktion beeinträchtigt und kann das Blut nicht mehr in dem Bedarf des Körpers entsprechenden Menge fördern, es entsteht eine Herzinsuffizienz. Dabei können der Herzinsuffizienz ein plötzliches Ereignis wie ein Herzinfarkt, chronische Verhältnisse wie Hypertonie oder Klappenfehler oder aber hereditäre Ursachen zugrunde liegen.

Im Frühstadium kann der Körper durch die oben erwähnten Kompensationsmechanismen das Herzzeitvolumen aufrechterhalten, am Patienten zeigen sich keine klinischen Symptome. Dies wird als Stadium der Kompensation oder wie hier im folgenden als asymptomatische linksventrikuläre Dysfunktion (ALVD) bezeichnet.

Im fortgeschrittenen Stadium der Herzinsuffizienz, der dekompensierten Herzinsuffizienz, kommt es zu einem Wirkungsverlust der Kompensationsmechanismen. Der regulierende Effekt des Sympathikus über Katecholamine verliert durch eine Down-Regulation myokardialer β_1 -Rezeptoren infolge des permanent hohen Katecholaminspiegels an Wirkung, während die vasokonstriktive Wirkung der Katecholamine an peripheren α -Rezeptoren erhalten bleibt. Als Folge steigt die Nachlast bei verminderter Inotropie und Chronotropie. Die inhibitorische Funktion der Barorezeptoren ist infolge einer Desensibilisierung vermindert, wodurch deren kontrollierende Wirkung auf RAAS und Sympathikus, und somit auf Gefäßtonus sowie auf die Natrium- und Wasserretention abnimmt. Auch der Frank-Starling-Mechanismus verliert bei zu hohem enddiastolischem ventrikulärem Druck an Wirksamkeit und kann der Herzmuskelschwäche nicht mehr entgegenwirken.

Die erhöhte Aktivität des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, ein überschießender Kompensationsversuch und die daraus resultierende gesteigerte Bildung von Angiotensin II, verursacht letztendlich Apoptose, Hypertrophie der Myozyten, interstitielle Fibrose, sowie kardiales und vaskuläres Remodeling.

Die myokardiale Hypertrophie stellt im Stadium der kompensierten Herzinsuffizienz einen wichtigen Kompensationsmechanismus dar. Mit zunehmender Hypertrophie jedoch wird vermehrt Kollagen synthetisiert und kardiale Fibroblasten proliferieren. Es kommt zu Veränderungen der ventrikulären Geometrie. Hämodynamische Einflüsse führen zu Veränderungen der myokardialen Genexpression. Dabei handelt es sich nicht einfach um einen quantitativen Anstieg kontraktiler Elemente, sondern um qualitative Veränderungen der Genexpression, begleitet von einem kontinuierlichen Verlust von Myozyten durch Apoptose (73). Dies führt zu einer Verschlechterung der Kontraktilität. Durch diese als Remodeling bezeichneten Umbauvorgänge nimmt die ventrikuläre Steifigkeit zu, was zu verminderter diastolischer Relaxation der Ventrikel und somit zu erhöhtem enddiastolischem Druck in den

Kammern führt. Je höher der intramurale Druck steigt, desto stärker wird die Koronarperfusion erschwert. Je größer die Vorlast wird, desto mehr steigt der myokardiale Sauerstoffbedarf. Mit steigendem Nachlassen der kardialen Pumpfunktion verringert sich die Koronarreserve, die Differenz zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot wird immer größer und es entstehen subendokardiale Ischämien. Dies wird durch einen Anstieg des Niveaus von Lactat, Adenosintriphosphat und Kreatinphosphat widergespiegelt. Durch Tachykardien werden die subendokardialen Ischämien aufrechterhalten, wobei die Diastole verkürzt und somit die koronare Durchblutung vermindert wird. All diese Veränderungen erhöhen die Inzidenz von malignen Herzrhythmusstörungen (8, 24, 26, 34).

1.6 Natriuretische Peptide

Brain natriuretic peptide (BNP) ist eines von drei natriuretischen Peptiden (42, 70). Zu dieser Gruppe strukturell ähnlicher, aber genetisch unterschiedliche Peptide mit Einfluss auf die kardiovaskuläre, renale und endokrine Homöostase gehören neben BNP noch das atriale natriuretische Peptid (ANP) sowie das C-Typ natriuretische Peptid (CNP) (40, 42, 44, 65). BNP verdankt seinem Namen der Tatsache, dass es erstmals im Gehirn von Schweinen nachgewiesen werden konnte, ist aber wie ANP kardialen Ursprungs (38, 43, 49). CNP wird im Gegensatz zu ANP und BNP nicht im Herzen, sondern vom Gefäßendothel, im Zentralnervensystem und in Nierenepithelzellen gebildet und ausgeschüttet (40, 43, 44, 48). Die Synthese und Ausschüttung natriuretischer Peptide wird stimuliert von der kardialen Wanddehnung, der ventrikulären Dilatation und erhöhtem Druck als Folge einer Flüssigkeitsüberlastung (39, 50, 51). Als mögliche Ursachen erhöhter Plasmaspiegel von ANP und BNP gelten neben der Herzinsuffizienz mit erhöhtem linksventrikulärem enddiastolischem Druck auch ein erhöhtes intravasales Volumen mit daraus resultierender erhöhter Vorlast und atrialer Wandspannung, eine Niereninsuffizienz mit verminderter Clearance der Natriuretischen Peptide sowie eine verstärkte Reaktion auf Zytokine, die das kardiale Wachstum stimulieren (39, 40, 44).

Wie bei vielen physiologisch aktiven Proteinen werden auch ANP und BNP über zunächst inaktive Vorstufen gebildet

ANP entsteht aus dem aus 151 Aminosäuren bestehenden Vorläufer preproANP und wird zunächst als inaktive Vorstufe in atrialen Granula gespeichert. Erst bei der durch die atriale Wandspannung stimulierten Ausschüttung aus den Granula wird durch eine Serumprotease

das aktive ANP abgespalten. Auch in der Niere wird das ANP-Gen exprimiert und kann dort durch alternative Bearbeitungsvorgänge ein 32-Aminosäure Peptid, bezeichnet als Urodilatin, bilden. Möglicherweise spielt dieses Peptid eine Rolle bei der lokalen Regulation des Natrium- und Wasserhaushalts (40, 42, 44).

BNP wird hauptsächlich in den Ventrikeln aus der 134 Aminosäuren bestehende Vorstufe preproBNP gebildet und im Gegensatz zu ANP direkt, ohne in Granula gespeichert zu werden, sezerniert, weshalb die Produktion und Sekretion von BNP genetisch nachvollzogen werden kann (40, 41, 44).

ANP und BNP werden in Vorhöfen und Ventrikeln unterschiedlich stark exprimiert. Während ANP auch im gesunden Herzen in den Vorhöfen zu finden ist, so ist BNP dort nur spärlich exprimiert. Bei der Progression einer Herzinsuffizienz dagegen steigt BNP, vor allem im linken Ventrikel, deutlich stärker als ANP an (38, 39, 43).

Die Hauptfunktion des Natriuretischen Systems liegt im Schutz des kardiovaskulären Systems vor den Effekten einer Volumenbelastung.

Die Peptide binden an spezifische transmembranöse Guanylatzyklase-Rezeptoren, genannt Natriuretischer Peptidrezeptor A (NPR-A) und B, welche in diversen verschiedenen Geweben vorkommen (44, 48, 49). Durch Bindung an NPR-A bewirken ANP und BNP die Konversion von Guanosin Triphosphat (GTP) zu zyklischem Guanosin-3',5'-Monophosphat (cGMP), welches als Botenstoff fungiert und eine ausgeprägt vasodilatative sowie das Myokard relaxierende Wirkung hat (40, 48, 49). Auch hier zeigen sich Interaktionen zwischen ANP und ANG II, welches unter bestimmten Umständen die ANP-Rezeptoren down-reguliert (74).

ANP und BNP scheinen die gleichen Reaktionen auszulösen. Sie verursachen eine Verlagerung des intravasalen Volumens aus den Kapillaren ins Interstitium, eine Erhöhung der glomerulären Filtration sowie eine Senkung der Natriumresorption und bewirkt somit Natriurese und Diurese. Durch Entspannung der glatten Gefäßmuskulatur führen sie zu arterieller und venöser Dilatation und somit zu Blutdrucksenkung und verminderter ventrikulärer Vorlast. Beide Hormone blockieren die Aktivität des sympathischen Nervensystems über periphere und zentrale sympathoinhibitorische Effekte. Das System der natriuretischen Peptide hemmt die Renin-Angiotensin-Aldosteron-Achse sowie das Endothelin-1 (ET-1) System und dient so als natürlicher Antagonist des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) bei der Regulation von Blutdruck und Flüssigkeitshaushalt durch direkte Blockade der Freisetzung von Renin aus Nierenzellen und von Aldosteron aus

Nebennierenzellen. Durch die Hemmung des RAAS vermindert das Natriuretische System auch dessen oben genannte Auswirkungen auf Apoptose und Hypertrophie der Myozyten, interstitielle Fibrose im Herz, sowie auf kardiales und vaskuläres Remodeling.

Dabei zeigte sich für BNP eine zwei- bis dreifach stärkere natriuretische und Blutdruck senkende Wirkung im Vergleich zu ANP sowie eine direkt relaxierende Wirkung im Myokard (40, 44, 48, 49, 50, 51, 65).

Durch die Antagonisierung des RAAS und die blutdrucksenkende Wirkung liegt die Vermutung nahe, dass das Natriuretische System dem Übergang von kompensatorischer kardialer Hypertrophie über interstitielle Fibrose und Remodeling dem kontinuierlichen Verlust von Myozyten durch Apoptose und somit der kardialen Dilatation und der Entwicklung einer Herzinsuffizienz entgegenwirkt (73).

Die Plasma Halbwertszeit beträgt bei ANP 3 min, bei BNP dagegen 21 min (49), wobei der Abbau natriuretischer Peptide über verschiedenen Wege von statthen geht. Zum einen dient ein weiterer natriuretischer Rezeptor (NPR-C) der Clearance natriuretischer Peptide, indem er sie bindet ohne cGMP als second messenger zu aktivieren und sie aus dem Blutkreislauf entfernt (40, 41, 42, 44). Alternativ werden BNP und andere zirkulierende natriuretische Peptide durch einem Enzym, die Neutrale Endopeptidase (NEP) abgebaut.

Die Genexpression von ANP und BNP unterscheiden sich wie bereits erwähnt im Ort der Synthese sowie im Stadium der höchsten Exprimierung. Der Zeitpunkt maximaler Expression natriuretischer Peptide wird in den Vorhöfen eher erreicht als im Gewebe des linken Ventrikels (38, 43, 44). In den Atrien suffizienter Herzen kann sowohl mRNA von ANP als auch von BNP nachgewiesen werden, wobei BNP nur sehr schwach und ANP vielfach stärker exprimiert ist (38, 39). Im Stadium beginnender linksventrikulärer Dysfunktion kommt es zu einem signifikanten Anstieg der Expression beider natriuretischer Peptide in den Atrien, wobei der relative Anstieg von BNP deutlich stärker ausfällt als bei ANP. Bei Progredienz der Herzinsuffizienz sistiert der Anstieg beider Peptide. Im Stadium chronischer Herzinsuffizienz überwiegt in den Atrien eindeutig die Expression von BNP gegenüber der Expression von ANP (38, 39, 43).

Deutliche Unterschiede zeigen sich bei der ventrikulären Genexpression von ANP und BNP. Im linken Ventrikel gesunder Herzen findet die Expression von ANP meist nicht statt und auch BNP ist nur in geringen Mengen nachzuweisen, überwiegt jedoch deutlich gegenüber ANP. Bei beginnender Herzinsuffizienz kommt es zu einem starken Anstieg beider Peptide, wobei bei weiterer Progredienz die ANP Expression sistiert, wohingegen die linksventrikuläre

Expression von BNP bei chronischer Herzinsuffizienz weiterhin stark ansteigt (38). Vergleicht man dies mit der linksventrikulären systolischen Wandspannung, so zeigt sich klar eine direkt proportionale Koppelung beider Verläufe (38, 39).

Letztendlich ist ANP bei normaler ventrikulärer Funktion das dominante kardiale natriuretische Peptid, während BNP kaum exprimiert wird. Bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz spielt dagegen BNP im ventrikulären Myokard eine übergeordnete Rolle und zeigt auch in den Atrien bei progredienter Herzinsuffizienz eine zunehmende Aktivierung.

Sein Maximum erreicht die atriale Expression natriuretischer Peptide im Stadium der ELVD (early left ventricular dysfunction), wohingegen die chronische Herzinsuffizienz durch einen weiteren starken Anstieg hauptsächlich von BNP gekennzeichnet ist (44).

Aus diesen Gründen bietet sich die linksventrikuläre BNP-Expression als Marker linksventrikulärer Überlastung bei chronischer Herzinsuffizienz vor allem in Kombination mit linksventrikulärer Hypertrophie an, zumal BNP die im Vergleich zu ANP längere Halbwertszeit, schnelle Produktion und direkte Freisetzung ohne Speicherung aufweist (38, 39, 43).

Mit einer Sensitivität von 71%-97% und einer Spezifität von 84%-87%, einem negativ prädiktivem Wert von 97% und einem positiv prädiktivem Wert von 70% konnte die prognostische Aussagekraft der BNP Konzentration bei Patienten mit Herzinsuffizienz und linksventrikulärer Hypertrophie mit einer Einschränkungen der Ejektionsfraktion < 35% bereits in mehreren Studien nachgewiesen werden (39, 42, 47). Ein Anstieg der BNP-Expression geht einher mit einer erhöhten Mortalität, unabhängig von Alter, NYHA-Stadium, vorhergehenden Herzinfarkten oder linksventrikulärer Ejektionsfraktion (41, 44).

Allerdings sind eine Reihe an Faktoren zu beachten, die den Plasmaspiegel natriuretischer Peptide beeinflussen können. Dazu zählen der zirkadiane Rhythmus, Alter und Geschlecht ($\text{♀} > \text{♂}$), die körperliche Belastung mit erhöhter Herzfrequenz und klinische Kondition. Renale Erkrankungen führen durch erhöhte Volumenbelastung ebenso wie chronische Lungenerkrankungen durch Belastung des rechten Vorhofs und Ventrikels zu einem Anstieg von BNP (42). Auch Medikamente wie Diuretika, ACE-Hemmer, Sympathomimetika, Schilddrüsenhormone sowie Glukokortikoide können sich auf die Menge zirkulierender natriuretischer Peptide auswirken (39, 40, 42).

1.7 IL-6

Im Laufe der letzten zehn Jahre wurde erkannt, dass in der Pathogenese der Herzinsuffizienz auch proinflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin-6 (IL-6) sowie IL-6-verwandte Zytokine eine wichtige Rolle spielen (59, 60).

IL-6 gehört zu einer Zytokinfamily zu der neben IL-6 die Zytokine IL-11, Cardiotropin-1 (CT-1), Oncostatin-M (OSM), Leukämie-inhibierender Faktor (LIF), ziliarer neurotropher Faktor (CNTF) und Neues Neurotrophin-1/B Zellstimulierender Faktor-3 (NNT-1/BSF-3) gezählt werden.

Der für diese Zytokine spezifische Rezeptor besteht aus mehreren Untereinheiten, die alle neben ihren spezifischen Rezeptorkomponenten ein gemeinsames transmembranöses Glycoprotein, bezeichnet als gp130 zur Signaltransduktion benutzen (58, 59, 60). Einige Zytokine, darunter IL-6, können nicht direkt an gp 130 binden, sondern müssen zuerst an die spezifischen Rezeptor- α -Untereinheiten wie dem IL-6 Rezeptor (IL-6R) binden. Nachdem gp 130 in nahezu jedem Gewebe vorkommen, ist die Wirkung von IL-6 abhängig von der Anwesenheit des spezifischen Rezeptors IL-6R in der jeweiligen Zelle oder Gewebe. Da im Myokard keine IL-6 Rezeptoren exprimiert sind, ist es von großer Bedeutung für die Wirksamkeit von IL-6 im Herzmuskel, dass IL-6 nicht auf membrangebundenen IL-6R angewiesen ist, da im Blut löslicher IL-6R (sIL-6R) zirkuliert. Gebildet wird sIL-6R durch proteolytische Lösung des membranständigen IL-6R von der Zelloberfläche (60).

Die physiologischen Funktionen der mit IL-6 verwandten Zytokine sind sehr vielfältig.

Neben einem negativ inotropen Einfluss auf isolierten Papillarmuskel spielen IL-6 und IL-6-verwandte Zytokine am Herz vor allem bei dem schlechenden Übergang von kompensatorischer Myokardhypertrophie zu beginnender Herzinsuffizienz eine zentrale Rolle, einerseits durch Erhöhung der Hypertrophie kardialer Myozyten und andererseits durch Schutz kardialer Myozyten vor Apoptose (59, 60). Dabei ist bei Herzinfarkt, Ischämie, Reperfusion, Abstoßung oder Herzinsuffizienz vermutlich das Myokard und das interstitielle Gewebe im rechten Ventrikel neben den Endothelzellen und der glatten Muskulatur des peripheren Gefäßsystems selbst der Ort der Synthese (59, 60). In unserem Versuchsmodell konnte IL-6 in ventrikulärem Myokard nachgewiesen werden. In Atheromen können auch Makrophagen und T-Zellen das mit ca. vier Stunden relativ kurzlebige IL-6 sezernieren (61).

Ein Anstieg des Plasma-IL-6-Spiegels kann bei reduzierter Kontraktilität, bei erhöhter Vorlast, bei gesteigerter Herzfrequenz sowie bei reduzierter Nachlast in Patienten mit

verschlechterter linksventrikulärer Pumpfunktion gemessen werden. Als stimulierender Reiz für das Endothel und die glatte Muskulatur peripherer Gefäße dient die mechanische Dehnung. Die ventrikuläre IL-6-mRNA Expression korreliert mit reduzierter linksventrikulärer Ejektionsfraktion sowie mit erhöhtem rechtsatrialen Druck, Herzfrequenz und pulmonarem Kapillardruck (59, 60). Auch bei entzündlichen Veränderungen der Gefäßwände im Rahmen einer Arteriosklerose wurden erhöhte Plasmaspiegel proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, IL-1 β und IL-8 beschrieben (61).

Gesteigert wird die Synthese von IL-6 dabei von Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Renin-Angiotensin-Aldosteron-System sowie von adrenerger Stimulation, hauptsächlich über gesteigerte Expression in der Peripherie (60). Im Myokard dagegen scheint die Expression von der adrenergen Stimulation unabhängig zu sein (60).

1.8 Vasopeptidase-Inhibitoren

Die Wirkung der Vasopeptidase-Inhibitoren (VPI) erfolgt auf zwei verschiedenen Wegen. Zum Einen hemmen sie das Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) und somit die Bildung von Angiotensin II und Aldosteron. Ebenso vermindern sie den Abbau von Bradykinin, eines potenteren Stimulators des L-Arginin und Cyclooxygenase-Stoffwechselwegs (65, 70). Dadurch treten die Wirkungen des RAAS, wie die Down-Regulation von ANP-Rezeptoren, die Förderung der Hypertrophie und Apoptose kardialer Myozyten, die interstitielle Fibrose im Myokard, sowie kardiales und vaskuläres Remodeling vermindert auf (24, 69, 74). Parallel dazu werden die Wirkungen des Bradykinin verstärkt. Dies führt zu Inaktivierung von O₂-Radikalen, verbesserter Glukoseaufnahme, verminderter Fibrosierung, Hemmung der Leukozytenadhäsion und Freisetzung von tPA, sowie über verminderte endotheliale Freisetzung von NO und Eicosanoiden sowie verminderte Bildung von Prostacyclin zu Vasodilatation (65, 70, 72).

Zum Anderen bewirken sie die Inhibition der Neutralen Endopeptidase (NEP), eine endotheliale, membrangebundene Metallopeptidase mit Zink an seiner aktiven Seite, welche endogene Peptide wie zum Beispiel Natriuretische Peptide an hydrophilen Resten bindet (41, 42, 44, 65, 70, 72). Sie öffnet hydrolytisch die Ringstruktur der natriuretischen Peptide und inaktiviert somit das Molekül (40).

Nachgewiesen werden konnte NEP in Endothelzellen, glatten Muskelzellen, kardialen Myozyten, renalen Epithelzellen und Fibroblasten, in der Lunge, im Darm, Nebennierendrüsen, Gehirn und im Herz. In diesen Geweben katalysiert NEP den Abbau

einer Vielzahl vasodilatativer Substanzen wie ANP, BNP, CNP, Substanz P, Adrenomedullin, Angiotensinfragment und Bradykinin, sowie einiger vasokonstriktiver Substanzen wie Endothelin-1 und Angiotensin II (41, 42, 44, 65, 69, 70, 74). Weitere Substrate der NEP stellen Enkephaline, Oxytoxin, Gastrin, IL-1 β , Gonadotropin Releasinghormon und dar (66, 74). Des Weiteren wird durch NEP-Inhibition auch das „big-Endothelin-Converting-Enzyme“ in seiner Aktivität gemindert, wodurch die Synthese von Endothelin-1 gehemmt wird (65).

Allerdings können durch die alleinige Hemmung der Neutralen Endopeptidase wie durch Candoxatril, Thiorphan und Phosphoramidon auch vasokonstriktive Peptide wie Angiotensin II und Endothelin-1 kumulieren, wodurch die arterielle Dilatation und so auch die blutdrucksenkende Wirkung unter selektiver Inhibition der NEP gering ausfallen, beziehungsweise in normotensiven Patienten sogar den Blutdruck erhöhen können (65, 70). Auch hat die alleinige Hemmung von NEP keinen Effekt auf die Apoptose von Myozyten oder kardiales Remodeling (73). Aus diesen Gründen ist die kombinierte Hemmung von NEP und ACE nahe liegend, da dadurch die Bildung und Kumulation von ANG II und Endothelin-1 gehemmt, beziehungsweise vermieden werden kann (65, 67).

Im Tiermodell konnte für Omapatrilat, dem in dieser Arbeit verwendeten VPI, neben einer durch Minderung des kardialen Remodeling, kardiomyozytärer Apoptose und Fibrose kardioprotektiven und blutdrucksenkenden Wirkung auch eine vasoprotektive Wirkung im Bereich der Widerstandsgefäße nachgewiesen werden, da Struktur und Endothelfunktion dieser Gefäße unter Omapatrilat verbessert erschienen (70).

Aus der Gruppe der VPIS wurden bereits Fastidotril und Sampatrilat und am ausführlichsten Omapatrilat in klinischen Studien getestet (74). Omapatrilat ist ein oral aktiver, lange wirkender selektiv kompetitiver Inhibitor der NEP und des ACE mit vergleichbarer K_i auf beide Enzyme (69, 74). Omapatrilat hat eine orale Bioverfügbarkeit von 30%, eine Proteinbindungsfähigkeit von 80% und ein sehr großes Verteilungsvolumen (69). Die Dauer bis zur höchsten Konzentration nach oraler Einnahme liegt bei 2-8 Stunden und seine effektive Halbwertszeit bei 14-19 Stunden (69, 70, 74). Metabolisiert wird Omapatrilat in der Leber, ohne dass im Blut aktive Metaboliten zurückblieben. Auch Interaktionen mit anderen Medikamenten sind für Omapatrilat nicht beschrieben (69), allerdings treten unter Omapatrilat gehäuft Angioödeme auf (70).

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten Kaninchen der Rasse Oryctolagus cuniculus (Chinchilla bastard). Die Unterbringung der Tiere erfolgte in Einzelkäfigen, als Futter erhielten sie bei täglicher Pflege Standardfutter (Ringkanin Mast), beliebig viel Wasser und waren einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12:12 Stunden ausgesetzt.

2.2 Schrittmacherimplantation

Präoperativ wurden die Kaninchen am Tag vor der Operation unter Sedierung mit Midazolam (Dormicum® 15/3) intramuskulär an Brust und Bauch rasiert.

Am Operationstag wurde die Narkose mit Ketaminhydrochlorid (Ketavet®) und Rompun® abwechselnd alle 30 Minuten intramuskulär durchgeführt. Nach Eintritt der Wirkung wurden die Tiere mit Pflasterstreifen an allen 4 Extremitäten am Tisch fixiert.

Zur weiteren Operationsvorbereitung wurde das Operationsgebiet mit Betaisodona desinfiziert und mit sterilen Tüchern sowie Inzisionsfolie (Opsite®) abgeklebt. Nachdem die Haut rechts der Tracheainzidiert wurde, erfolgte durch stumpfe Präparation des Subcutangewebes die Darstellung der rechten Vena jugularis interna in ihrem Verlauf. Durch zwei resorbierbare Fäden (Ethicon Vicryl®) wurde der freiliegende Gefäßabschnitt fixiert. Die Vene wurde am proximalen Ende ligiert und unterhalb der Ligatur mit einer spitzen Schere eröffnet. Durch diese Öffnung wurde ein Katheter (Cavatheter safe®, Vena basilika, Braun Melsungen) unter Durchleuchtung über die Vena jugularis interna in den rechten Vorhof eingeführt und so die Schrittmachersonde (2F, Medtronic) in der rechten Kammer platziert und im Endokard verankert. Dann wurde der Katheter wieder entfernt. Zur Fixierung wurde die Schrittmachersonde mit dem zweiten Faden am distalen Ende des freigelegten Gefäßstückes sowie zur Sicherung mit einem zusätzlichen subkutan geknüpften Faden festgebunden.

Der Schrittmacher selbst wurde im Bereich des Bauches untergebracht. Dazu erfolgte ein Hautschnitt entlang dem rechten Rippenbogen. Die Schrittmachertasche wurde stumpf erweitert. Als Schrittmacher wurde das Modell Minix® 8340 (Medtronic Inc., Minneapolis)

verwendet. Um eine Stimulierung der Bauchwandmuskulatur zu verhindern wurde der Schrittmacher durch eine Hülle aus Silikon isoliert und deren offene Seite nach ventral gelagert. Zur Verbindung von Schrittmacheraggregat und Schrittmacherelektroden wurde ein Gewebetunnel ebenfalls durch stumpfe Präparation vom Bauchschnitt aus auf den kranialen Hautschnitt im Brustbereich angelegt. Mit einer langen gebogenen Klemme konnte dann das Elektrodenkabel durch den Gewebetunnel nach unten gezogen und mit dem Schrittmacher konnektiert werden.

Zum Schluss wurden die Hautschnitte mit resorbierbarem Faden (Vicryl 3/0, 2metric, Fa. Ethicon, Norderstedt) vernäht.

Postoperativ wurde eine Pause von mindestens zwei Wochen zur körperlichen Regeneration der Tiere vor Aktivierung des Schrittmachers eingehalten.

2.3 Klinische Untersuchungen

2.3.1 Transthorakale Echokardiographie

Um die Entwicklung der beabsichtigten Herzinsuffizienz klinisch messen zu können wurden vor Aktivierung und unmittelbar vor Deaktivierung des Herzschrittmachers linksventrikulärer enddiastolische Diameter (LVEDd), linksventrikuläre enddiastolische und systolische Hinterwanddicke (LVPWd / LVPWs), interventrikuläre Septumdicke diastolisch (IVSd) und systolisch (IVSs), linksventrikulärer innerer Diameter diastolisch (LVIDd) und systolisch (LVIDs), Diameter der Aortenwurzel und die Verkürzungsfaktion mittels transthorakaler Echokardiographie gemessen. Dazu wurde ein Hewlett Packard HP 5500 mit einem 12MHz Schallkopf verwendet.

2.3.2 Hämodynamische Messungen

Zur invasiven Blutdruckmessung wurde die mediale Ohrarterie der Versuchstiere mit einer Venenverweilkanüle punktiert. Die Messung erfolgte mit einem Sechschanalschreiber (Hellige, Freiburg), als Druckaufnehmer diente das Modell Statham P23XL. Zur Testung der Sensibilität des Druckaufnehmers wurde das System mit NatriumChlorid gespült. Zur Eichung wurde vor jeder Messung ein Nullabgleich mit Markierung der Werte 0, 50 und 100 mmHg für systolischen, diastolischen und mittleren arteriellen Blutdruck durchgeführt.

2.3.3 Berechnung der linksventrikulären Wandspannung

Zur Berechnung der linksventrikulären Wandspannung dienten die Daten aus Echokardiographie und Blutdruckmessung. Benötigt werden der systolische Blutdruck, der linksventrikuläre diastolische Diameter (LVIDd), sowie die systolische linksventrikuläre Wanddicke. Setzt man diese Daten in die Formel nach Grossman ($\sigma_m = [P * R_i] / [2h * (1 + h / 2R_i)]$, P: systolischer Druck, R_i : innerer linksventrikulärer Radius, h: systolische Wanddicke) ein, so erhält man folgende Gleichung:

$$LVWS = (SAP \times LVIDs/2) / (LVPWs + IVSs) \times (1 + (LVPWs + IVSs) / 2 \times LVIDs)$$

2.4 Versuchsaufbau

Nach mindestens zwei Wochen Regenerationszeit wurden die Schrittmacher aktiviert. Zunächst wurde eine Frequenz von 330 bpm über 10 Tage programmiert, danach wurde die Frequenz auf 360 über 10 Tage und anschließend weitere 10 Tage auf 380 erhöht. Die Programmierung der Schrittmacheraggregate erfolgte mittels Medtronic9790C Programmer. Durch die Frequenz von 330bpm konnte bei den Versuchstieren eine asymptomatische linksventrikuläre Dysfunktion induziert werden, unter 360 bpm zeigten die Kaninchen erste Zeichen einer manifesten Herzinsuffizienz und unter 380 bpm stellte sich eine kongestive Herzinsuffizienz ein.

Bei einem Teil der Tiere wurde Omapatrilat, ein Vasopeptidase-Inhibitor über einen Zeitraum von 5 Tagen in einer Dosierung von 50 mg pro Tag über das Trinkwasser verabreicht. Bei der Gruppe der mit Omapatrilat behandelten und mit 360 und 380bpm stimulierten Tiere wurde von M. Bratfisch, einer Ko-Doktorandin, Gewebe zur Verfügung gestellt.

5 Tiere blieben ohne Schrittmacher und erhielten kein Omapatrilat um als Referenztiere zu dienen. In der Gruppe der asymptomatischen Herzinsuffizienz waren 9 Versuchstiere, davon erhielten 4 Omapatrilat, diese wurden von mir selbst behandelt. Die Gruppe im Stadium der kongestiven Herzinsuffizienz umfasste 15 Tiere, davon 8 Tiere mit Omapatrilat behandelt. Die Tiere der Gruppe der kongestiven Herzinsuffizienz wurden von Ko-Doktoranden behandelt.

Vor Aktivierung und nach Deaktivierung des Schrittmachers wurde jedes Tier gewogen, einer invasiven Blutdruckmessung unterzogen und echokardiographisch untersucht. Nach Ablauf der Stimulationsphase wurden die Versuchstiere getötet, das Herz wurde entnommen, in

Vorhöfe und Ventrikel geteilt und einzeln abgewogen. Zur sicheren Aufbewahrung und Konservierung wurden die Organe in Plastikbehälter verpackt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.5 RNA-Extraktion

Für die m-RNA Isolierung wurde der Invitrogen Fast Track 2.0 Kit Manual verwendet.

2.5.1 Vorbereitung

Zur Vorbereitung wurden alle benötigten Instrumente und Tubes mit DEPC-Wasser gereinigt, der Stock-Buffer (SDS) auf 65° erhitzt. Um die bei der Zelllyse austretenden RNAsen sofort zu inaktivieren, wurde das bei -80°C gefrorene Gewebe in 45°C warmen Lysis-buffer aufgetaut.

2.5.2 Homogenisierung

Zu Beginn der Homogenisierung wurde das Gewebe in gesäuberten Tüten verpackt mit einem Hammer zerkleinert. Dann wurde RNase und Protein Degrader zugegeben und mittels des Ultraturrax homogenisiert.

Im nächsten Schritt der RNA-Isolierung wurde die Gewebelösung zunächst 60 Minuten bei 34°C zur vollständigen Proteinverdauung und Zerstörung der RNAsen inkubiert.

Anschließend wurden 950 ul 5molare Natrium-Clorid-Lösung in jedes Tube gegeben, das Lysat 3-4 mal zur mechanischen Auflösung in sterile Spritzen gezogen und ausgespült und zur Bindung Oligo(dt)Cellulose zum Lysat gegeben und bei Raumtemperatur auf einem Rüttler 60 Minuten geschwenkt um die Bindung der m-RNA an die Oligo(dt)Cellulose zu erhöhen. Nach 60 Minuten auf dem Rüttler und nach einer 5 minütigen Zentrifugation bei 3000g wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und verworfen.

2.5.3 Reinigung

Das übrig gebliebene Lysat musste gewaschen werden. Dazu wurden 20 ml Binding Buffer auf das Pellet gegeben, bei 3000g 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Dieser Vorgang wurde mit 10 ml Binding Buffer einmal wiederholt, dann weitere 5mal mit Low Salt Wash Buffer, bis die Lösung keine Blasen mehr warf. Nach diesem ersten Schritt des Waschvorgangs wurden noch einmal 800 µl Low Salt Wasch Buffer zugefügt, mit einer Stabpipette das Pellet mit dem Buffer vermischt, die Emulsion in bereitgehaltene spin-

columns aus dem Kit pipettiert und in einer Tischzentrifuge 10 Sekunden bei 5000g zentrifugiert. Die erwähnten Spin-Columns sind spezielle Filter in Cups, so dass nach der Zentrifugation die Filter entnommen werden und der Inhalt des Cups verworfen werden konnte. Der Inhalt des Filters wurde mit 500 μ l Low Salt Wash Buffer gespült, mit einer sterilen Spitze der Pipette vermischt, 10 Sekunden lang mit 5000g zentrifugiert und der Inhalt des Cups verworfen. Dieser Vorgang wurde als letzter Schritt des Waschens insgesamt dreimal wiederholt.

2.5.4 Eluation und Präzipitation

Das Spin-Column wurde zur Eluation in ein neues Mikrozentrifugen Tube aus dem Kit umgesetzt. Durch die Zugabe von 200 μ l Eluation Buffer in das Cellulose-Bett und anschließender 30 Sekunden langer Zentrifugation bei 5000g wurde nun die m-RNA aus der Cellulose gelöst. Dieser Vorgang wurde ein- bis zweimal wiederholt, bis die Gesamtmenge des Eluats größer als 400 μ l war.

Um die Präzipitation der gewonnenen m-RNA zu erreichen, mussten, nachdem die Spin-Columns verworfen worden waren, 60 μ l 2Molares SodiumAcetat aus dem Kit sowie ein Milliliter hundertprozentigen Ethanols zugefügt werden.

Zur langfristigen Konservierung wurden die Cups bei -80°C eingefroren.

2.5.5 Determination

Um die bei -80°C gelagerte und in Ethanol gelöste RNA zu gewinnen, schloss sich als letzter Schritt die Determination an. Dazu mussten die Cups auf Eis auftauen und im Kühlraum 15 Minuten bei 4°C und 14000g zentrifugiert werden. Nachdem der Ethanolüberstand abpipettiert worden war, wurden die Cups erneut bei 14000g im Kühlraum bei 4 °C 15 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand vollständig abpipettiert und das Trocknen der Cups abgewartet. Um die RNA wieder in Lösung zu bringen wurden 50 μ l DEPC-H₂O resuspendiert. 2 μ l der RNA-Lösung wurden dann mit 148 μ l DEPC-H₂O versehen, und am Photometer die Konzentration bestimmt.

Die restliche RNA-Lösung wurde bei -80°C erneut eingefroren.

2.6 Transkription in cDNA

Um die Bildung von Proteinen und Hormonen durch eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) quantifizieren zu können, müssen die Informationen der RNA in cDNA mittels einer Reversen Transkriptase übertragen werden. Zu diesem Zweck wurde eine RT-PCR (SuperScriptTM One-Step RT-PCR mit Platinum[®]Taq, Invitrogen) nach folgendem Protokoll durchgeführt:

RNA 1µg	je nach Konzentration
Oligo dT	1µl
Autoklaviertes H ₂ O	x
Gesamt	10µl

Dieser Ansatz wurde über 70°C inkubiert. Nach 3 Minuten wurden weitere Reagenzien nach folgendem Protokoll hinzugefügt:

dNTP (2,5mM)	4µl
5xBuffer	4µl
RNasin (Promega)	1µl
Reverse Transkriptase (M-MCV Gibko)	1µl
Endvolumen	20µl

Nun wurde diese Lösung über 1 Stunde bei 37°C und über 2 Minuten bei 95°C inkubiert.

Anschließend wurde der Ansatz mit autoklaviertem H₂O auf 150µl aufgefüllt.

2.7 Realtime PCR mit LightCycler

Von den 150 µl cDNA-Lösung wurden 5 µl in den Ansatz für die Realtime PCR im LightCycler verwendet. Zusätzlich wurde ein PrimerA+B-Mix eingesetzt. Hierzu wurde von den ursprünglich 100µM Primerlösungen des Forward- und der Reward-Primers jeweils 10µl mit 80µl autoklaviertem H₂O auf 100 µl verdünnt, sodass die fertige Primerlösung jeweils 10 µM jedes Primers enthielt, von der bei jeder Reaktion 1µl eingesetzt wurde.

Die Primersequenz für IL-6 lautet:

forward primer: 5`-CTTCAGGCCAAGTTCAGGAG-3`

reverse primer: 5`-GGGTGGCTTCTTCATTCAAA-3`

Die Primersequenz für BNP lautet:

forward primer: 5`-CTCCTCTTGCACCTGTC-3`

reverseprimer: 5`-GTGTTCCCTGAGCACATTGC-3`

Als Reaktions Kit wurde der QuantiTect SYBR Green PCR Kit von Qiagen mit folgendem Protokoll eingesetzt:

2xQuantiTect SYBR Green PCR MasterMix	10µl
Primer A+B Mix	1µl
Template cDNA	5µl
Autoklaviertes H ₂ O	4µl
Total	20µl

2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit T-Test bei unabhängigen Proben und einfaktorieller ANOVA.

3 Ergebnisse

3.1 Blutdruck

	<u>Kontrolle</u>	<u>ALVD</u>	<u>CHF</u>	<u>ALVD+OMA</u>	<u>CHF+OMA</u>
<u>MAP</u> <u>(mmHg)</u>	78 ±1,8 *ALVD+OMA, CHF+OMA (n=22)	72 ±1,8 * CHF+OMA (n=5)	81 ±3,2 *ALVD+OMA, CHF+OMA (n=7)	61 ±7,7 * K, CHF (n=4)	53 ±4,9 * K, ALVD, CHF (n=8)
<u>SAP</u> <u>(mmHg)</u>	89 ±2,4 *CHF+OMA (n=22)	84 ±1,9 n.s. (n=5)	95 ±4,5 *ALVD+OMA, CHF+OMA (n=7)	71 ±9,2 * CHF (n=4)	64 ±6,2 * K, CHF (n=8)
<u>DAP</u> <u>(mmHg)</u>	71 ±1,9 * CHF+OMA (n=22)	66 ±1,1 * CHF+OMA (n=5)	74 ±3,0 *CHF+OMA (n=7)	58 ±9,3 * n.s. (n=4)	47 ±4,7 *K, ALVD, CHF (n=8)
* xxx: signifikant (p<0,05) vs xxx					

*xxx: Signifikanz (p<0,05) im Vergleich zu xxx, ALVD: asymptomatische linksventrikuläre Dysfunktion, CHF: Congestive Heart Failure, +OMA: mit Omapatrilat behandelt, MAP: mittlerer arterieller Blutdruck, SAP: systolischer arterieller Blutdruck, DAP: diastolischer arterieller Blutdruck, n.s.: kein signifikanter Unterschied

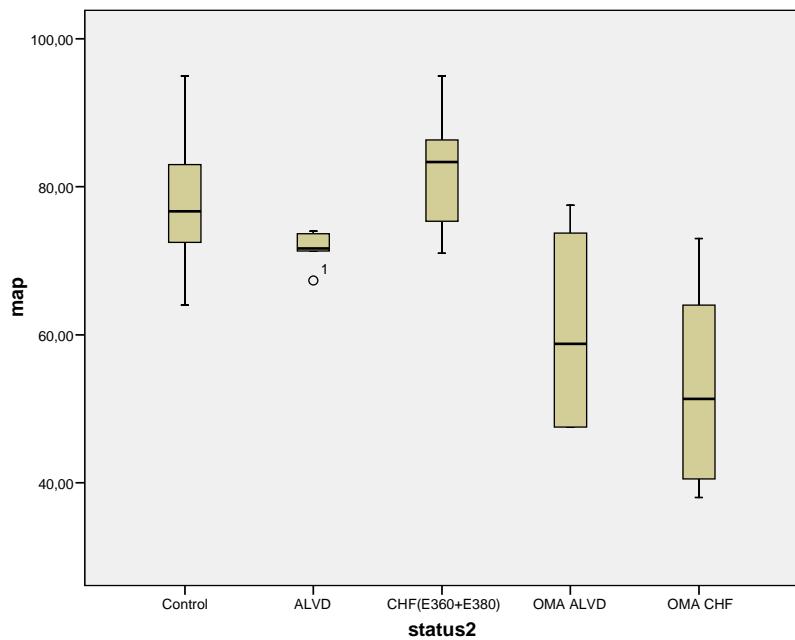
Tabelle 3.1 :

Mittlere Blutdruckwerte mit Standardfehler im Verlauf der fortschreitenden Herzinsuffizienz sowie unter Omapatrilat.

Im Stadium der asymptomatischen Herzinsuffizienz waren der mittlere (- 5% versus Kontrolle, n.s.), der systolische (-6% versus Kontrolle, n.s.) und der diastolische arterielle Blutdruck (-12% versus Kontrolle, n.s.) vermindert. Im Stadium der manifesten Herzinsuffizienz war ein erneuter, wenn auch nicht signifikante Anstieg der Werte zu verzeichnen.

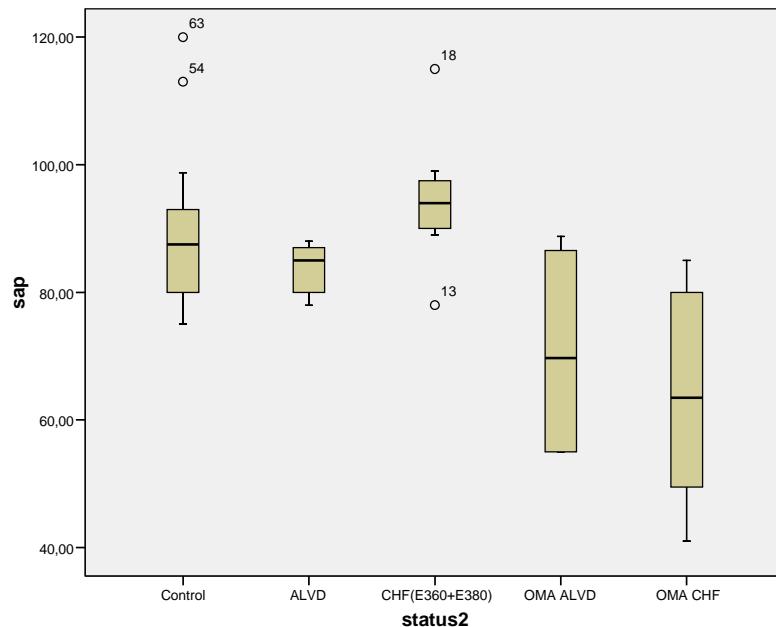
Unter Behandlung mit Omapatrilat kam es im Stadium der asymptomatischen linksventrikulären Dysfunktion zu einem weiteren deutlichen Blutdruckabfall (MAP 12% versus Kontrolle (p=0,03), DAP 19% versus Kontrolle (n.s.), SAP 20% versus Kontrolle (n.s.), Signifikanz war jedoch nur bei manifester Herzinsuffizienz sowohl im Vergleich zur

Kontrolle als auch zu manifester Herzinsuffizienz ohne Omapatrilat festzustellen [MAP 36% versus Kontrolle ($p=0,00$), DAP 34% versus Kontrolle ($p=0,01$), SAP 25% versus Kontrolle (n.s.)].



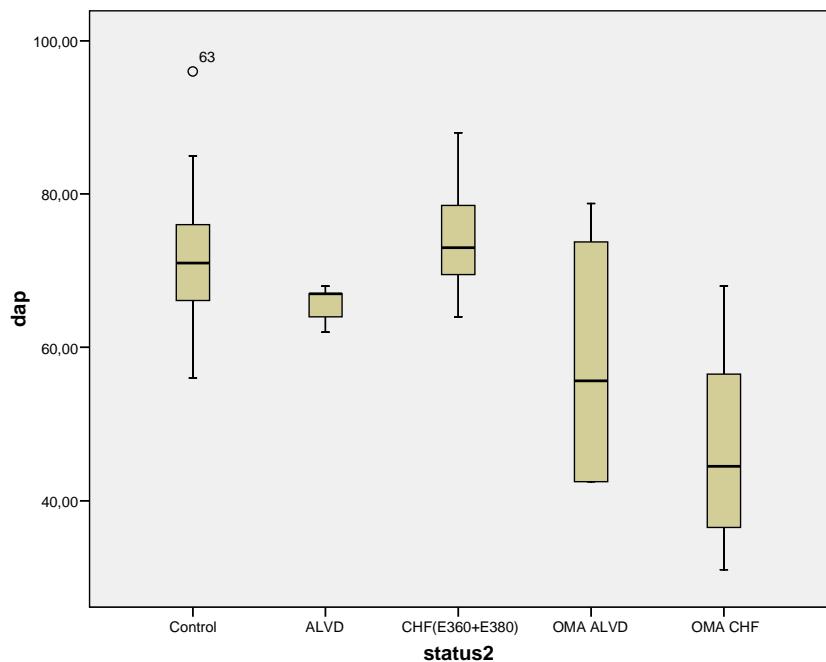
Graphik 3.1.1:

MAP im Verlauf der fortschreitenden Herzinsuffizienz sowie unter Omapatrilat



Graphik 3.1.2:

SAP im Verlauf der fortschreitenden Herzinsuffizienz sowie unter Omapatrilat



Graphik 3.1.3:

DAP im Verlauf der fortschreitenden Herzinsuffizienz sowie unter Omapatrilat

3.2 Echokardiographie

3.2.1 Fractional Shortening

	<u>Kontrolle</u>	<u>ALVD</u>	<u>CHF</u>	<u>ALVD+OMA</u>	<u>CHF+OMA</u>
<u>FS (%)</u>	$38,38 \pm 0,6$ (n=28)	$29,6 \pm 1,3$ * K (n=12)	$25,9 \pm 0,9$ * K (n=7)	$29,3 \pm 1,2$ * K (n=13)	$25,6 \pm 2,2$ * K (n=8)
* xxx: signifikant ($p < 0,05$) vs xxx					

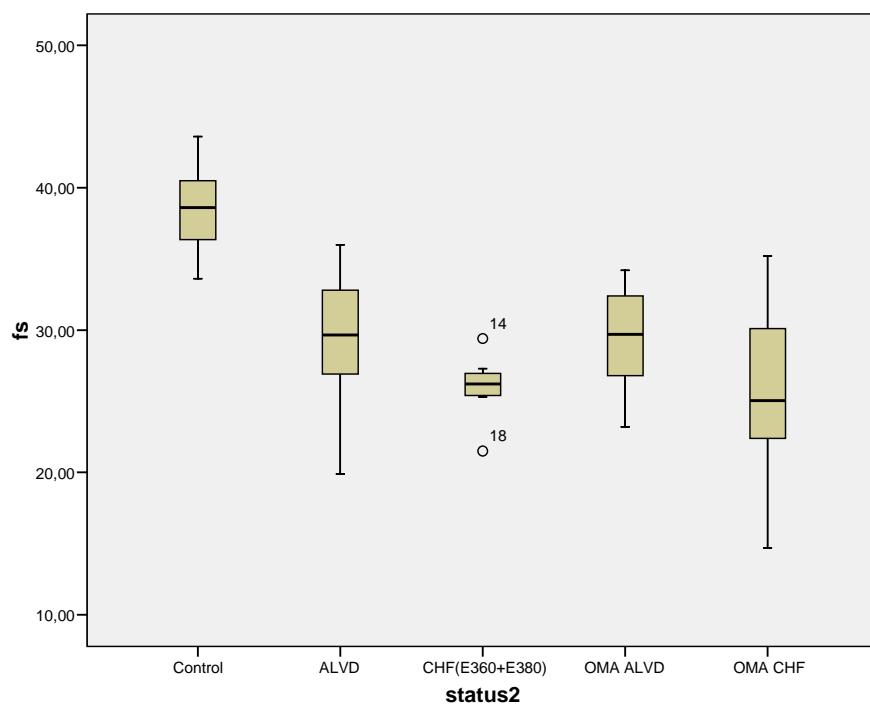
*xxx: Signifikanz ($p < 0,05$) im Vergleich zu xxx, ALVD: asymptotische linksventrikuläre Dysfunktion, CHF: Congestive Heart Failure, +OMA: mit Omapatrilat behandelt, FS (%): Linksventrikuläre Verkürzungsfraktion in Prozent

Tabelle 3.2.1 :

Entwicklung der mittleren linksventrikulären Verkürzungsfraktion (Fraction Shortening, fs) mit Standardfehler im Verlauf der fortschreitenden Herzinsuffizienz sowie unter Omapatrilat.

Im Verlauf der zunehmenden Herzinsuffizienz zeigt sich eine deutliche und signifikante Abnahme der linksventrikulären Verkürzungsfraktion. Im Stadium der asymptomatischen linksventrikulären Dysfunktion kommt es zu einer Abnahme der linksventrikulären Verkürzungsfraktion um 27% ($p=0,00$) im Vergleich zur Kontrolle, im Stadium der kongestiven Herzinsuffizienz um 40% ($p=0,00$) im Vergleich zur Kontrolle.

Unter Behandlung mit Omapatrilat zeigt sich kein signifikanter Unterschied zur linksventrikulären Verkürzungsfraktion bei Herzinsuffizienz ohne Behandlung. Es tritt im Vergleich zur CHF lediglich eine geringere Abnahme der Verkürzungsfraktion um ca. 32% im Vergleich zur Kontrolle auf.



Graphik 3.2.1

Linksventrikuläre Verkürzungsfraktion im Verlauf der fortschreitenden Herzinsuffizienz sowie unter Omapatrilat

3.2.2 Linksventrikuläre systolische Wandspannung

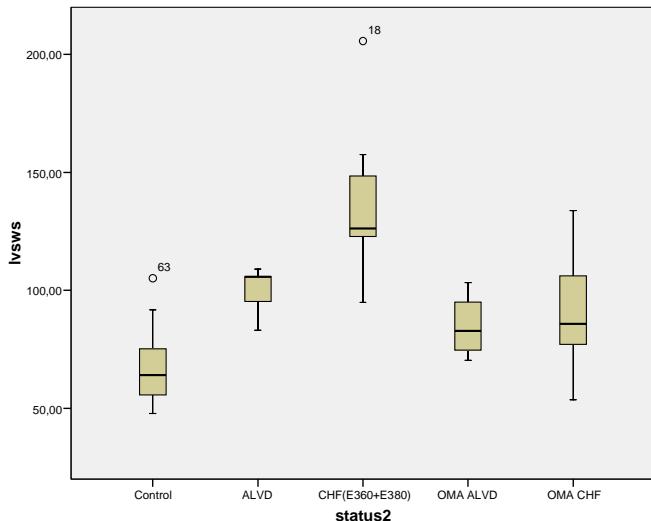
	<u>Kontrolle</u>	<u>ALVD</u>	<u>CHF</u>	<u>ALVD+OMA</u>	<u>CHF+OMA</u>
<u>LVSWS</u>	67,4 \pm 3,7 (n=23)	99,8 \pm 4,3 (n=5)	138,5 \pm 13,3 * K, CHF (n=7)	84,9 \pm 7,0 * CHF (n=4)	90,7 \pm 9,0 * CHF (n=8)
* xxx: signifikant ($p<0,05$) vs xxx					

*xxx: Signifikanz ($p<0,05$) im Vergleich zu xxx, n.s.: kein signifikanter Unterschied, ALVD: asymptotische linksventrikuläre Dysfunktion, CHF: Congestive Heart Failure, +OMA: mit Omapatrilat behandelt, LVSWS: linksventrikuläre systolische Wandspannung

Tabelle 3.2.2 :

Entwicklung der linksventrikulären systolischen Wandspannung (g/cm^2) mit Standardfehler im Verlauf der fortschreitenden Herzinsuffizienz sowie unter Omapatrilat.

Im Stadium der asymptotischen linksventrikulären Herzinsuffizienz zeigt sich eine deutliche und signifikante Zunahme der linksventrikulären Wandspannung (30%, $p= 0,005$) im Vergleich zur Kontrollgruppe, die im weiteren Verlauf erneut signifikant weiter steigt. Im Stadium CHF unter Behandlung mit Omapatrilat kommt es zwar im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls zu einem Anstieg, jedoch fällt dieser signifikant geringer aus.



Graphik 3.2.2

Entwicklung der linksventrikulären systolischen Wandspannung (g/cm^2) im Verlauf der fortschreitenden Herzinsuffizienz sowie unter Omapatrilat

3.2.3 Linksventrikulärer enddiastolischer Diameter

	<u>Kontrolle</u>	<u>ALVD</u>	<u>CHF</u>	<u>ALVD+OMA</u>	<u>CHF+OMA</u>
<u>LVEDD</u> <u>(mm)</u>	$15 \pm 0,2$ *ALVD, CHF, CHF+OMA (n=23)	$17,4 \pm 0,4$ *K, ALVD+OMA (n=12)	$18,2 \pm 0,6$ * K, ALVD+OMA (n=7)	$15,5 \pm 0,4$ * ALVD, CHF OMA-CHF (n=13)	$17,9 \pm 0,3$ * K, ALVD+ OMA (n=8)
	* xxx: signifikant ($p < 0,05$) vs xxx				

*xxx: Signifikanz ($p < 0,05$) im Vergleich zu xxx, ALVD: asymptotische linksventrikuläre Dysfunktion, CHF: Congestive Heart Failure, +OMA: mit Omapatrilat behandelt, LVEDD: linksventrikulärer enddiastolischer Diameter

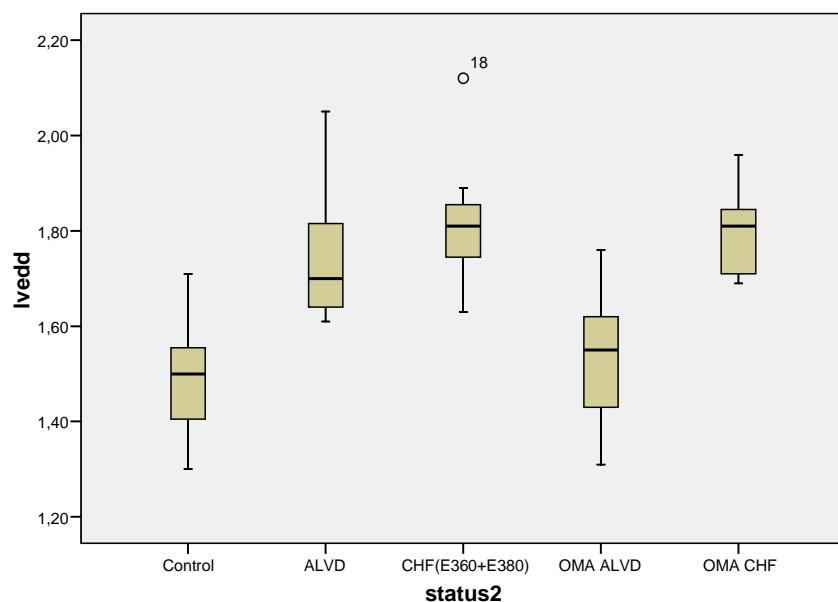
Tabelle 3.2.3:

Entwicklung des linksventrikulären enddiastolischen Diameters mit Standardfehler im Verlauf der fortschreitenden Herzinsuffizienz sowie unter Omapatrilat.

Im Stadium der asymptotischen linksventrikulären Dysfunktion zeigt sich ein signifikanter Anstieg des linksventrikulären Diameters um 16% im Vergleich zur Kontrolle. Im weiteren Verlauf der Herzinsuffizienz verdeutlicht sich diese Entwicklung, im Stadium der kongestiven

Herzinsuffizienz kommt es zu einer signifikanten Erhöhung des linksventrikulären Diameters um 21% ($p=0,028$) im Vergleich zur Kontrolle.

Unter Therapie mit Omapatrilat ist zunächst im Stadium der ALVD eine deutliche, signifikante Verringerung der linksventrikulären Dilatation um 11% ($p=0,003$) im Vergleich zur ALVD zu verzeichnen, welche im weiteren Verlauf der CHF jedoch auch signifikant in eine Dilatation umschlägt (+19% versus Kontrolle, $p=0,00$).



Graphik 3.2.3

Entwicklung des linksventrikulären enddiastolischen Diameters im Verlauf der fortschreitenden Herzinsuffizienz sowie unter Omapatrilat

3.2.4 Linksventrikulärer posteriorer Wanddurchmesser

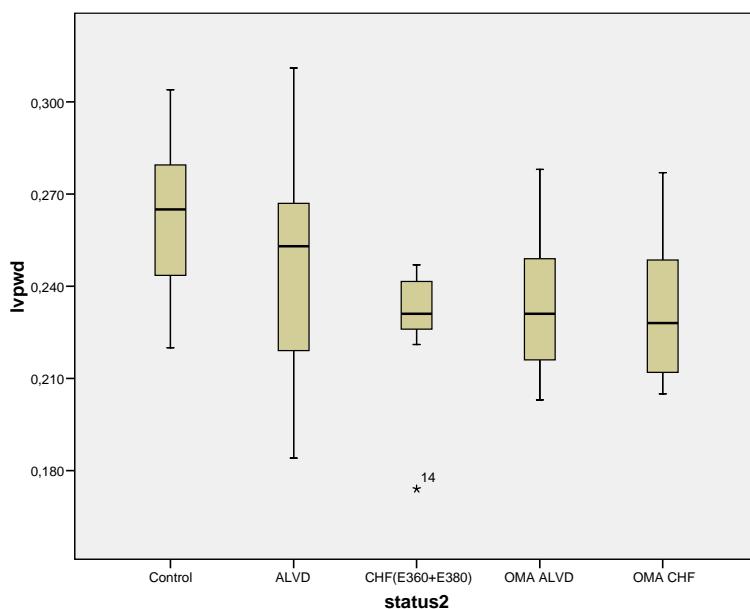
	<u>Kontrolle</u>	<u>ALVD</u>	<u>CHF</u>	<u>ALVD+OMA</u>	<u>CHF+OMA</u>
<u>LVPWD</u> (mm)	$2,6 \pm 0,05$ (n=23)	$2,5 \pm 0,1$ n.s. (n=12)	$2,3 \pm 0,1$ * K (n=7)	$2,3 \pm 0,1$ * K (n=13)	$2,3 \pm 0,1$ n.s. (n=8)
* xxx: signifikant ($p<0,05$) vs xxx					

*xxx: Signifikanz ($p<0,05$) im Vergleich zu xxx, n.s.: kein signifikanter Unterschied, ALVD: asymptomatics linksventrikuläre Dysfunktion, CHF: Congestive Heart Failure, +OMA: mit Omapatrilat behandelt, LVPWD: linksventrikulärer posteriorer Wanddurchmesser

Tabelle 3.2.4 :

Entwicklung des linksventrikulären posterioren Wanddurchmessers mit Standardfehler im Verlauf der fortschreitenden Herzinsuffizienz sowie unter Omapatrilat.

Im Verlauf der progredienten Herzinsuffizienz kommt es zu einer leichten und im Stadium der kongestiven Herzinsuffizienz signifikanten (-11%, $p=0,04$) Verminderung des linksventrikulären posterioren Wanddurchmessers. Diese Verminderung ist unter Behandlung mit Omapatrilat auch zu erkennen, allerdings ohne Signifikanz.



Graphik 3.2.4

Entwicklung des linksventrikulären posterioren Wanddurchmessers im Verlauf der fortschreitenden Herzinsuffizienz sowie unter Omapatrilat.

3.3 Na/K- Exkretion

3.3.1 Natrium

3.3.1.1 Natriumkonzentration im Urin

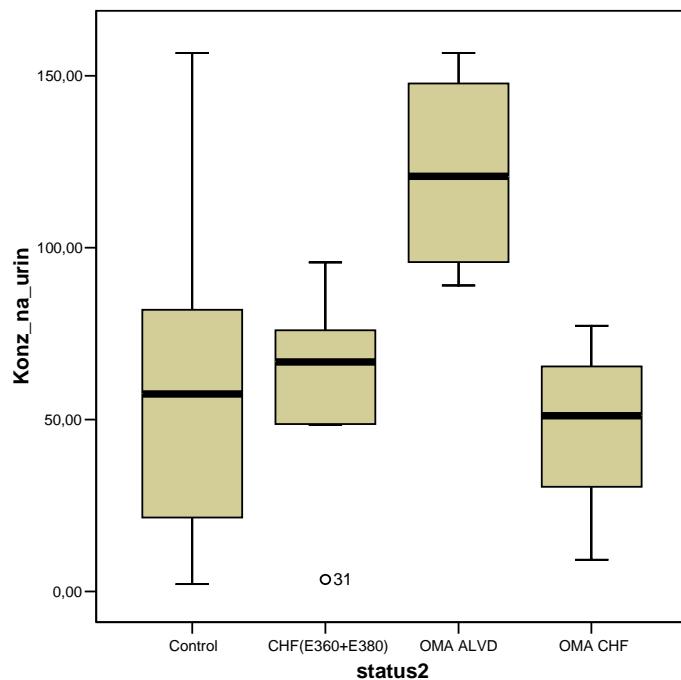
	<u>Kontrolle</u>	<u>CHF</u>	<u>ALVD+OMA</u>	<u>CHF+OMA</u>
<u>Na (mmol/l)</u>	60,4 ±8,7 (n=22)	59,4 ±11,3 *OMA-ALVD (n=7)	121,8 ±15,7 *Kontrolle, CHF, OMA-CHF (n=4)	47,6 ±8,8 *OMA-ALVD (n=8)
	* xxx: signifikant (p<0,05) vs xxx			

*xxx: Signifikanz (p<0,05) im Vergleich zu xxx, n.s.: kein signifikanter Unterschied, ALVD: asymptomatische linksventrikuläre Dysfunktion, CHF: Congestive Heart Failure, +OMA: mit Omapatrilat behandelt, Na (mmol/l): Natriumkonzentration im Urin

Tabelle 3.3.1.1

Entwicklung der Natriumkonzentration im Urin in mmol/l mit Standardfehler im Verlauf der fortschreitenden Herzinsuffizienz sowie unter Omapatrilat.

Im Laufe der fortschreitenden Herzinsuffizienz zeigt sich keine wirkliche oder signifikante Änderung der Konzentration des Urinnatriums. Unter Behandlung mit Omapatrilat dagegen kommt es im Stadium der ALVD zu einem deutlichen und signifikanten Anstieg der Urinnatriumkonzentration auf 202% (p=0,009) im Vergleich zur Kontrolle. Im weiteren Verlauf der Herzinsuffizienz sinkt die Konzentration des Urinnatriums wieder um 61% (p=0,009) sogar auf 79% im Vergleich zur Kontrolle. Ein Vergleich zwischen ALVD und ALVD unter Omapatrilat ist aufgrund der geringen Fallzahl der Gruppe ALVD ohne Omapatrilat (n=1) nicht möglich.



Graphik 3.3.1.1

Entwicklung der Natriumkonzentration im Urin in mmol/l im Verlauf der fortschreitenden Herzinsuffizienz sowie unter Omapatrilat

3.3.1.2 24h-Natrium-Exkretion

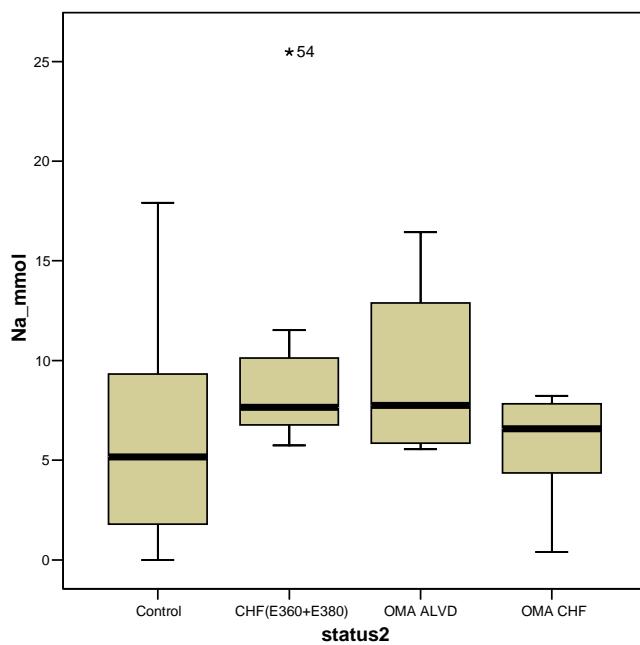
	<u>Kontrolle</u>	<u>CHF</u>	<u>ALVD+OMA</u>	<u>CHF+OMA</u>
<u>Na</u> <u>(mmol/24h)</u>	$5,8 \pm 0,98$ (n=24)	$10,4 \pm 2,6$ n.s. (n=7)	$9,4 \pm 2,5$ n.s. (n=4)	$5,5 \pm 1,4$ n.s. (n=5)
* xxx: signifikant ($p < 0,05$) vs xxx				

*xxx: Signifikanz ($p < 0,05$) im Vergleich zu xxx, n.s.: kein signifikanter Unterschied, ALVD: asymptomatische linksventrikuläre Dysfunktion, CHF: Congestive Heart Failure, +OMA: mit Omapatrilat behandelt,
Na (mmol/24h): Natrium im Urin in mmol/24h

Tabelle 3.3.1.2

Entwicklung der Tages-Natriumausscheidung im Urin in mmol/24h mit Standardfehler im Verlauf der fortschreitenden Herzinsuffizienz sowie unter Omapatrilat.

Parallel zur fortschreitenden Herzinsuffizienz steigt die renale Ausscheidung von Natrium um 80%, eine signifikante Erhöhung ist jedoch nicht zu verzeichnen. Unter Behandlung mit Omapatrilat zeigt sich zunächst im Stadium der asymptomatischen linksventrikulären Dysfunktion eine nicht signifikant erhöhte 24-Stunden-Natriumausscheidung (60%) im Vergleich zur Kontrolle, im Stadium der kongestiven Herzinsuffizienz kommt es zu einer geringgradigen (5%), ebenfalls nicht signifikanten Minderung der renalen Natriumausscheidung im Vergleich zur Kontrollgruppe.



Graphik 3.3.1.2

Entwicklung der Tages-Natriumausscheidung im Urin in mmol/24h im Verlauf der fortschreitenden Herzinsuffizienz sowie unter Omapatrilat

3.3.2 Kalium

3.3.2.1 Kaliumkonzentration im Urin

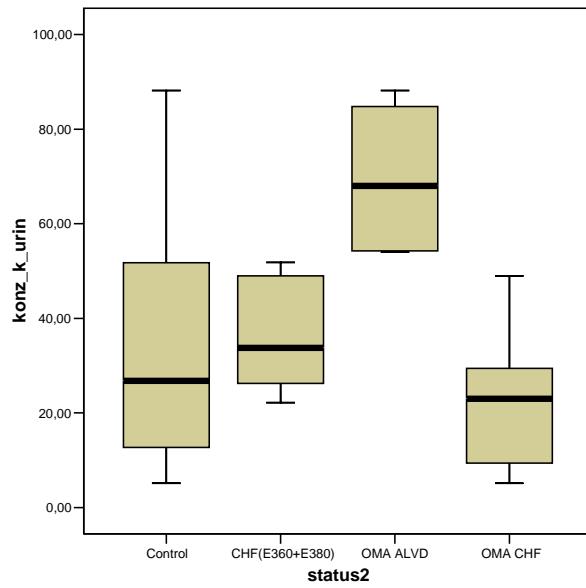
	<u>Kontrolle</u>	<u>CHF</u>	<u>ALVD+OMA</u>	<u>CHF+OMA</u>
<u>K (mmol/l)</u>	$33,6 \pm 5,0$ (n=22)	$36,9 \pm 4,8$ *OMA-ALVD (n=7)	$69,5 \pm 8,9$ *Kontrolle, CHF, OMA-CHF (n=4)	$22,2 \pm 5,2$ *OMA-ALVD (n=8)
* xxx: signifikant (p<0,05) vs xxx				

*xxx: Signifikanz (p<0,05) im Vergleich zu xxx, , n.s.: kein signifikanter Unterschied, ALVD: asymptomatische linksventrikuläre Dysfunktion, CHF: Congestive Heart Failure, +OMA: mit Omapatrilat behandelt, K (mmol/l): Kaliumkonzentration im Urin

Tabelle 3.3.2.1

Entwicklung der Kaliumkonzentration im Urin in mmol/l mit Standardfehler im Verlauf der fortschreitenden Herzinsuffizienz sowie unter Omapatrilat.

Während der Entwicklung einer Herzinsuffizienz (CHF) kommt es zu einem nicht-signifikanten Anstieg der Kaliumkonzentration im Urin auf 109,8% des Ausgangswertes in der Kontrollgruppe. Unter Omapatrilat kommt es zunächst zu einem signifikanten Anstieg um 107% auf 207% im Vergleich zur Kontrolle im Stadium der ALVD. Im Stadium der CHF kommt es zu einem erneuten signifikanten Rückgang der Kaliumkonzentration um 34% auf 66% im Vergleich zur Kontrollgruppe.



Graphik 3.3.2.1

Entwicklung der Kaliumkonzentration im Urin in mmol/l im Verlauf der fortschreitenden Herzinsuffizienz sowie unter Omapatrilat

3.3.2.2 24h-Kalium-Exkretion

	<u>Kontrolle</u>	<u>CHF</u>	<u>ALVD+OMA</u>	<u>CHF+OMA</u>
<u>K(mmol/24h)</u>	$2,8 \pm 0,4$ (n=24)	$4,5 \pm 0,54$ * K (n=7)	$5,4 \pm 1,4$ * K (n=4)	$2,8 \pm 1,1$ n.s. (n=5)
* xxx: signifikant ($p < 0,05$) vs xxx				

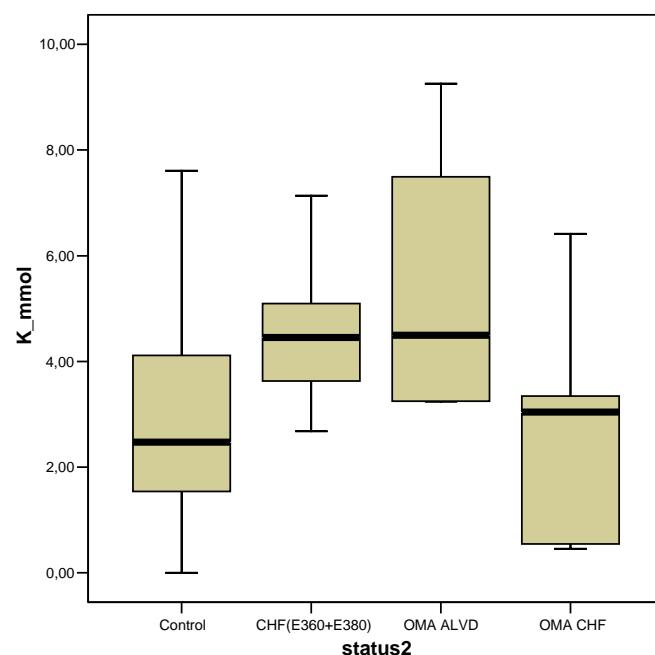
*xxx: Signifikanz ($p < 0,05$) im Vergleich zu xxx, , n.s.: kein signifikanter Unterschied, ALVD: asymptomatische linksventrikuläre Dysfunktion, CHF: Congestive Heart Failure, ±OMA: mit Omapatrilat behandelt, K (mmol/24h): Kaliumausscheidung im Urin in mmol/24h

Tabelle 3.3.2.2

Entwicklung der Kaliumausscheidung im Urin in mmol/24h mit Standardfehler im Verlauf der fortschreitenden Herzinsuffizienz sowie unter Omapatrilat.

Die renale Kaliumausscheidung in 24 Stunden steigt im Stadium der kongestiven Herzinsuffizienz um 60% signifikant an. Unter Behandlung mit Omapatrilat kommt es zu

einer weiteren, nicht signifikanten Steigerung um 93% im Vergleich zur Kontrolle im Stadium der asymptomatischen linksventrikulären Dysfunktion. Im weiteren Verlauf der Herzinsuffizienz kommt es zu einem deutlichen Rückgang auf Werte wie in der Kontrollgruppe, jedoch ohne signifikanten Unterschied zur kongestiven Herzinsuffizienz ohne Behandlung (-48% im Vergleich zu CHF, n.s).



Graphik 3.3.2.2

Entwicklung der Kaliumausscheidung im Urin in mmol/24h im Verlauf der fortschreitenden Herzinsuffizienz sowie unter Omapatrilat

3.3.3 Urinvolumen / Bilanz

3.3.3.1 Urinausscheidung

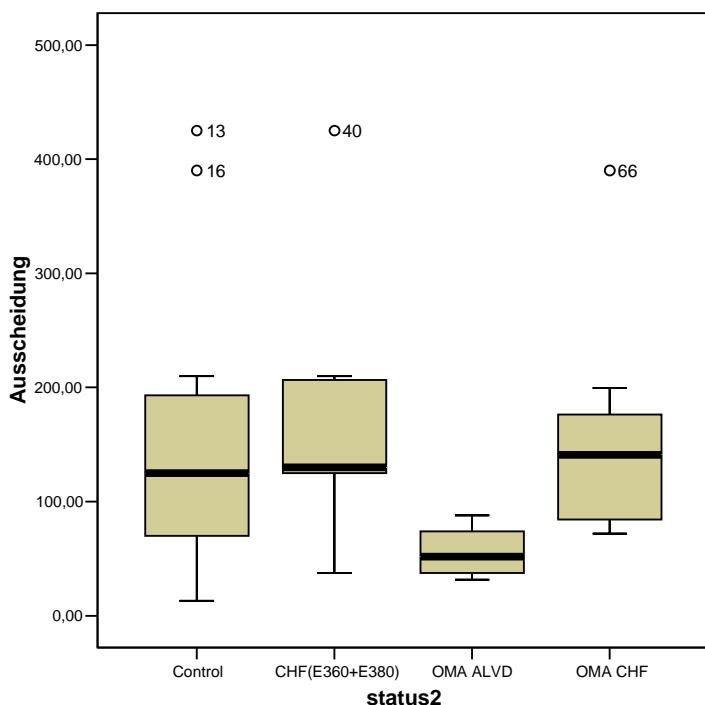
	<u>Kontrolle</u>	<u>CHF</u>	<u>ALVD+OMA</u>	<u>CHF+OMA</u>
<u>Ausscheidung</u> <u>(ml/24h)</u>	$137,2 \pm 22,4$ *ALVD+OMA (n=22)	$179,4 \pm 46,4$ *ALVD+OMA (n=7)	$55,8 \pm 12,2$ *K, CHF, CHF+OMA (n=4)	$158,1 \pm 36,5$ *ALVD+OMA (n=8)
* xxx: signifikant ($p<0,05$) vs xxx				

*xxx: Signifikanz ($p<0,05$) im Vergleich zu xxx, , n.s.: kein signifikanter Unterschied, ALVD: asymptomatische linksventrikuläre Dysfunktion, CHF: Congestive Heart Failure, +OMA: mit Omapatrilat behandelt, Ausscheidung (ml/24h): Ausscheidung in ml/24h

Tabelle 3.3.3.1

Entwicklung der durchschnittlichen Urinausscheidung in ml/24h mit Standardfehler im Verlauf der fortschreitenden Herzinsuffizienz sowie unter Omapatrilat.

Im Verlauf der Herzinsuffizienz zeigt sich ein geringgradiger und nicht signifikanter Anstieg der durchschnittlichen Ausscheidung im Stadium der CHF. Über die Ausscheidung im Stadium der ALVD kann aufgrund der niedrigen Fallzahl keine Aussagen getroffen werden. Im Stadium der ALVD unter Behandlung mit Omapatrilat kommt es dagegen zu einem signifikantem ($n=0,004$) Rückgang der Ausscheidung auf 41% im Vergleich zur Kontrolle. Im weiteren Verlauf kommt im Stadium der CHF unter Behandlung mit Omapatrilat zu einem signifikantem ($n=0,028$) Anstieg der Ausscheidung auf 283% im Vergleich zu ALVD unter Omapatrilat, bzw. 115% im Vergleich zur Kontrolle. Zur Kontrollgruppe besteht im Stadium der CHF unter Omapatrilat kein signifikanter Unterschied mehr.



Graphik 3.3.3.1

Entwicklung der durchschnittlichen Ausscheidung in ml/24h im Verlauf der fortschreitenden Herzinsuffizienz sowie unter Omapatrilat

3.3.3.2 Trinkmenge

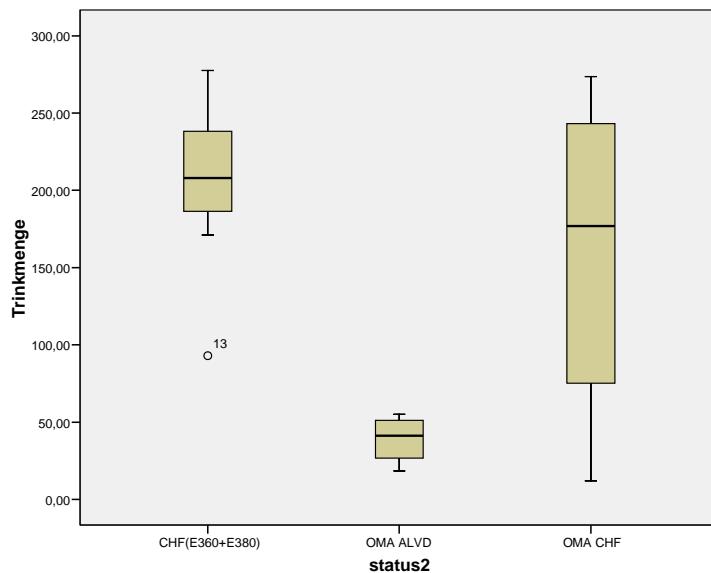
	<u>Kontrolle</u>	<u>ALVD</u>	<u>CHF</u>	<u>ALVD+OMA</u>	<u>CHF+OMA</u>
<u>Trinkmenge</u> <u>(ml/24h)</u>	n.v.	n.v.	204 ±23 *ALVD+OMA n=7	39 ±8 *CHF, CHF+OMA n=4	160 ±34 *ALVD+OMA n=8
* xxx: signifikant (p<0,05) vs xxx					

*xxx: Signifikanz ($p<0,05$) im Vergleich zu xxx, ,n.v.: nicht verfügbar, n.s.: kein signifikanter Unterschied, ALVD: asymptotische linksventrikuläre Dysfunktion, CHF: Congestive Heart Failure, +OMA: mit Omapatrilat behandelt, Trinkmenge (ml/24h): Trinkmenge in ml/24h

Tabelle 3.3.3.2

Entwicklung der durchschnittlichen Trinkmenge in ml/24h mit Standardfehler im Verlauf der fortschreitenden Herzinsuffizienz sowie unter Omapatrilat.

Aufgrund der niedrigen Fallzahlen können Kontrolle und ALVD nicht gewertet werden. Dieser Teil der Tiere wurde durch Kodoktoranden betreut, in deren Versuchen eine Bilanzierung nicht vorgesehen war. Zwischen den Tieren im Stadium CHF und den mit Omapatrilat behandelten Tieren im Stadium der manifesten Herzinsuffizienz zeigt sich ein geringer, aber nicht signifikanter Rückgang der Trinkmenge auf 78%. Im Stadium der ALVD unter Omapatrilat zeigt sich eine signifikant erniedrigte Trinkmenge im Vergleich zu CHF ($p=0,008$) und CHF +OMA ($p=0,05$).



Graphik 3.3.3.2

Entwicklung der durchschnittlichen Trinkmenge in ml/24h im Verlauf der fortschreitenden Herzinsuffizienz sowie unter Omapatrilat

3.3.3.3 Bilanz

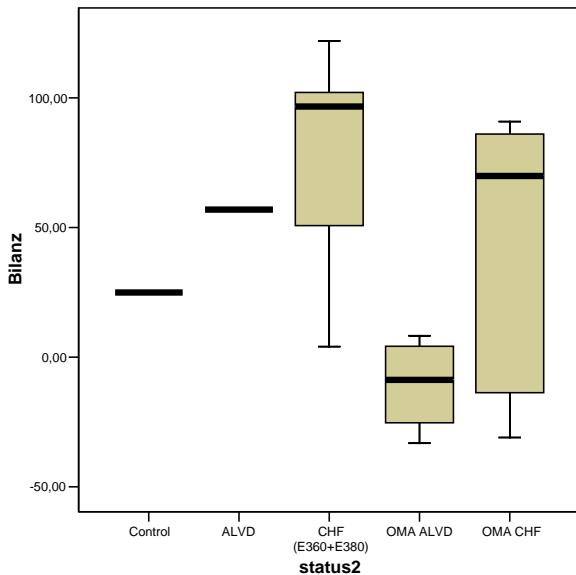
	<u>Kontrolle</u>	<u>CHF</u>	<u>ALVD+OMA</u>	<u>CHF+OMA</u>
<u>Metabolische Bilanz (ml/24h)</u>	88,3 ± 15,1 (n=1)	75,5 ± 17,5 *ALVD+OMA (n=7)	-10,6 ± 9,3 *CHF (n=4)	43,1 ± 18,9 n.s. (n=8)
	* xxx: signifikant (p<0,05) vs xxx			

*xxx: Signifikanz (p<0,05) im Vergleich zu xxx, , n.s.: kein signifikanter Unterschied, ALVD: asymptomatische linksventrikuläre Dysfunktion, CHF: Congestive Heart Failure, +OMA: mit Omapatrilat behandelt,
Metabolische Bilanz (ml/24h): Bilanz Einfuhr/Ausfuhr in ml/24h

Tabelle 3.3.3.3

Entwicklung der Flüssigkeitsbilanz mit Standardfehler im Verlauf der fortschreitenden Herzinsuffizienz sowie unter Omapatrilat.

Aufgrund der niedrigen Fallzahl kann ALVD nicht gewertet werden, auch der Vergleich zur Kontrollgruppe ist aus denselben Gründen nicht möglich. Der Hauptteil der Kontrolltiere wurde durch Kodoktoranden betreut, in deren Versuchen eine Bilanzierung nicht vorgesehen war. Im Vergleich der CHF und der Entwicklung der Herzinsuffizienz unter Behandlung mit Omapatrilat zeigt sich zunächst im Stadium der ALVD mit Omapatrilat ein signifikanter (n=0,007) Rückgang um 114% mit einer Umkehrung der bislang positiven Bilanz ins Negative. Im weiteren Verlauf kehrt sich dies wieder um in eine positive Bilanz mit einem deutlichem aber nicht signifikantem Anstieg um 506%.



Graphik 3.3.3.3

Entwicklung der Bilanz in ml/24h im Verlauf der fortschreitenden Herzinsuffizienz sowie unter Omapatrilat

3.4. Gewicht

3.4.1 Körpergewicht

	<u>Kontrolle</u>	<u>ALVD</u>	<u>CHF</u>	<u>ALVD+OMA</u>	<u>CHF+OMA</u>
<u>KG</u>	$3,5 \pm 0,1$ (n=18)	$3,7 \pm 0,194$ * n.s. (n=12)	$3,64 \pm 0,2$ * n.s. (n=7)	$3,43 \pm 0,1$ * n.s. (n=13)	$3,26 \pm 0,13$ * n.s. (n=8)
* xxx: signifikant ($p < 0,05$) vs xxx					

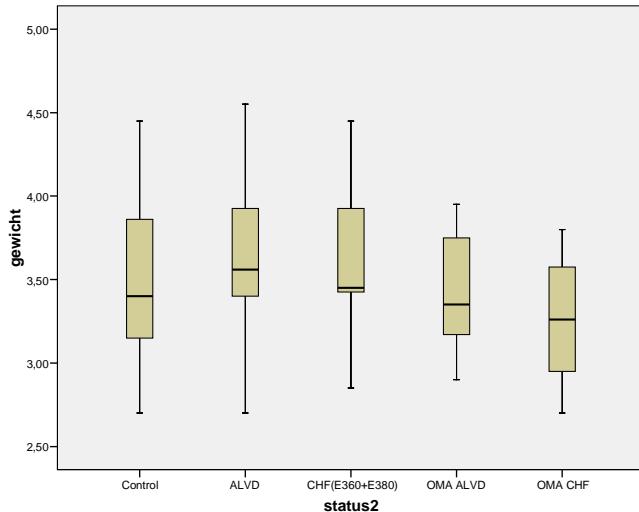
*xxx: Signifikanz ($p < 0,05$) im Vergleich zu xxx, ALVD: asymptomatische linksventrikuläre Dysfunktion, CHF: Congestive Heart Failure, +OMA: mit Omapatrilat behandelt, KG: Körpergewicht in kg

Tabelle 3.4.1 :

Entwicklung des Körpergewichts in kg mit Standardfehler im Verlauf der fortschreitenden Herzinsuffizienz sowie unter Omapatrilat.

Im Verlauf der progredienten Herzinsuffizienz kommt es zu einer nicht-signifikanten Zunahme des Körpergewichts. Während im Stadium der ALVD eine geringe Zunahme zu

verzeichnen ist, kommt es im Stadium der kongestiven Herzinsuffizienz wieder zu einem Rückgang im Vergleich zu ALVD. Unter Behandlung mit Omapatrilat dagegen kommt es zu einer deutlichen, allerdings nicht signifikanten Reduzierung des Körpergewichts (-10%, im Vergleich zu CHF)



Graphik 3.4.1

Entwicklung des Körpergewichts in kg im Verlauf der fortschreitenden Herzinsuffizienz sowie unter Omapatrilat

3.4.2 Linksventrikuläres Gewicht

	<u>Kontrolle</u>	<u>ALVD</u>	<u>CHF</u>	<u>ALVD+OMA</u>	<u>CHF+OMA</u>
<u>Gewicht LV</u>	$4,73 \pm 0,15$ n.s. (n=5)	$4,59 \pm 0,21$ n.s. (n=5)	$5,08 \pm 0,26$ n.s. (n=7)	$4,23 \pm 0,34$ n.s. (n=4)	$4,82 \pm 0,18$ n.s. (n=8)
	* xxx: signifikant ($p < 0,05$) vs xxx				

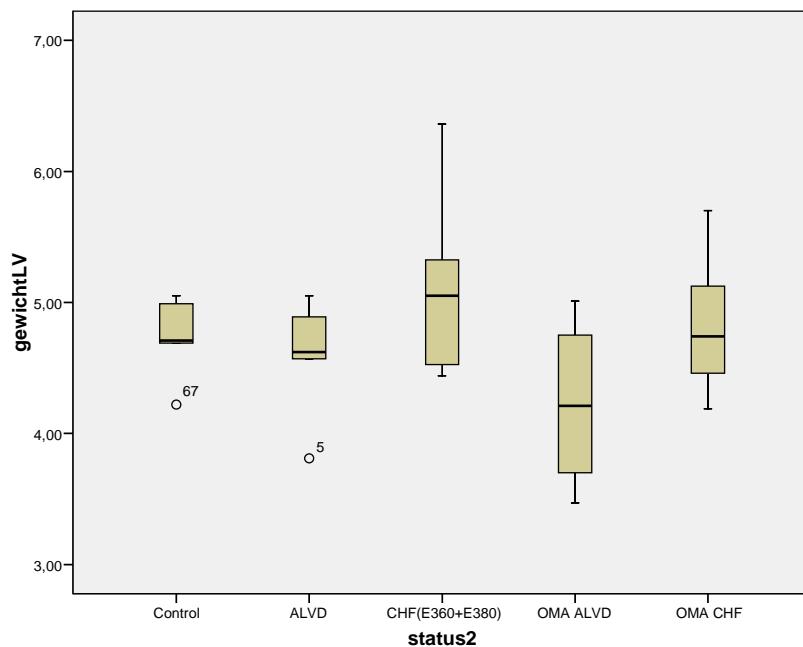
*xxx: Signifikanz ($p < 0,05$) im Vergleich zu xxx, ALVD: asymptomatische linksventrikuläre Dysfunktion, CHF: Congestive Heart Failure, +OMA: mit Omapatrilat behandelt, Gewicht LV: linksventrikuläres Gewicht in g

Tabelle 3.4.2:

Entwicklung des linksventrikulären Gewichts in g mit Standardfehler im Verlauf der fortschreitenden Herzinsuffizienz sowie unter Omapatrilat.

Im Verlauf der Herzinsuffizienz ist lediglich eine leichte Zunahme (+11%, n.s.) des linksventrikulären Gewichts im Stadium der kongestiven Herzinsuffizienz zu verzeichnen.

Unter Medikation mit Omapatrilat kommt es im Stadium der asymptomatischen linksventrikulären Herzinsuffizienz zunächst zu einer nichtsignifikanten Minderung (-12%) des linksventrikulären Gewichts, im Stadium der kongestiven Herzinsuffizienz kommt wie in der unbehandelten Gruppe zu einem nicht signifikanten Anstieg um 14% im Vergleich zu ALVD, allerdings nur um 2% im Vergleich zur Kontrolle. Damit bleibt das LV-Gewicht unter Behandlung geringer als ohne Behandlung.



Graphik 3.4.2

Entwicklung des linksventrikulären Gewichts in g im Verlauf der fortschreitenden Herzinsuffizienz sowie unter Omapatrilat

3.4.3 Linksventrikulärer Masseindex (KG/LV)

	<u>Kontrolle</u>	<u>ALVD</u>	<u>CHF</u>	<u>ALVD+OMA</u>	<u>CHF+OMA</u>
<u>Linksventrikulärer Masseindex bzgl. Sectio-KG</u>	1,3 ±0,1 (n=5)	1,2 ±0,1 *Oma-CHF (n=5)	1,4 ±0,1 n.s. (n=7)	1,2 ±0,1 n.s. (n=4)	1,5 ±0,1 *ALVD (n=8)
* xxx: signifikant (p<0,05) vs xxx					

*xxx: Signifikanz (p<0,05) im Vergleich zu xxx, n.s.: kein signifikanter Unterschied, ALVD: asymptomatische linksventrikuläre Dysfunktion, CHF: Congestive Heart Failure, +OMA: mit Omapatrilat behandelt, Masseindex: Gewicht LV (g) / Körpergewicht (kg)

Tabelle 3.4.3a)

Entwicklung des Masseindex mit Standardfehler im Verlauf der fortschreitenden Herzinsuffizienz sowie unter Omapatrilat im Bezug auf das KG zum Zeitpunkt der Sectio.

	<u>Kontrolle</u>	<u>ALVD</u>	<u>CHF</u>	<u>ALVD+OMA</u>	<u>CHF+OMA</u>
<u>Linksventrikulärer Masseindex bzgl. Baseline-KG</u>	1,3 ±0,1 n.s. (n=5)	1,3 ±0,1 *CHF (n=5)	1,5 ±0,1 *ALVD (n=7)	n.v. (n=0)	1,4 ±0,04 n.s. (n=8)
* xxx: signifikant (p<0,05) vs xxx					

*xxx: Signifikanz (p<0,05) im Vergleich zu xxx, n.s.: kein signifikanter Unterschied, n.v.: nicht verfügbar, ALVD: asymptomatische linksventrikuläre Dysfunktion, CHF: Congestive Heart Failure, +OMA: mit Omapatrilat behandelt, Masseindex: Gewicht LV (g) / Körpergewicht (kg)

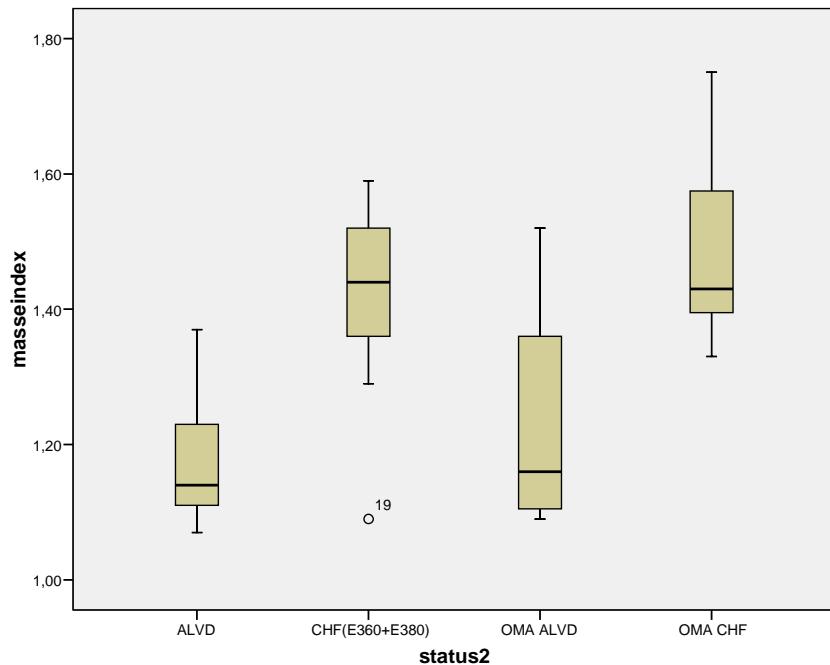
Tabelle 3.4.3b)

Entwicklung des Masseindex mit Standardfehler im Verlauf der fortschreitenden Herzinsuffizienz sowie unter Omapatrilat im Bezug auf das KG bei Versuchsbeginn.

Im Verlauf der Herzinsuffizienz von ALVD zu CHF kommt es zu einer deutlichen, aber nicht signifikanten Zunahme um 17% des Masseindex aus dem Gewicht des linken Ventrikels im

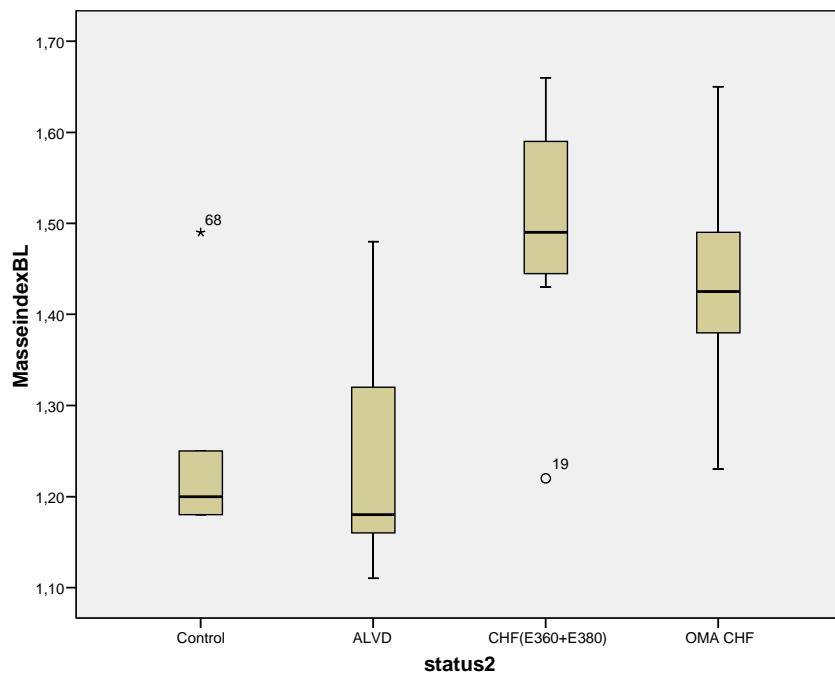
Verhältnis zum Körpergewicht. Unter Therapie mit Omapatrilat zeigt sich zunächst im Stadium der asymptomatischen linksventrikulären Dysfunktion keine Veränderung des Masseindex im Vergleich zur unbehandelten ALVD-Gruppe, im weiteren Verlauf steigt im Stadium der kongestiven Herzinsuffizienz der Masseindex und somit das Gewicht des linken Ventrikels im Verhältnis zum Körpergewicht um 25% gegenüber der behandelten ALVD aufgrund des reduzierten Körpergewichts nicht signifikant an.

Bezieht man die Entwicklung des linksventrikulären Gewichtes statt auf das Körpergewicht zum Zeitpunkt der Sectio auf das Körpergewicht zu Versuchsbeginn (KG BL), so kann man den Verlauf des linksventrikulären Gewichtes unverfälscht durch die Veränderungen des Körpergewichtes im Verlaufe des Versuches beobachten. Hier zeigt sich dann eine deutlich, aber nicht signifikante Verminderung der Zunahme des LV-Masseindex_{Baseline} (7% geringer als LV-Masseindex_{Sectio}) und somit des Gewichts des linken Ventrikels im Verhältnis zum Körpergewicht. Bei ALVD-Oma liegen keine Baseline-Gewichte vor, so dass hier keine Signifikanzen berechnet werden konnten.



Graphik 3.4.3a)

Entwicklung des Masseindex linksventrikulären Gewichts in g im Verlauf der fortschreitenden Herzinsuffizienz sowie unter Omapatrilat [Gewicht LV (g) / Körpergewicht (kg)] im Bezug auf das KG zum Zeitpunkt der Sectio.



Graphik 3.4.3b)

Entwicklung des Masseeindex linksventrikulären Gewichts in g im Verlauf der fortschreitenden Herzinsuffizienz sowie unter Omapatrilat [Gewicht LV (g) / Körpermengewicht (kg)] im Bezug auf das KG bei Versuchsbeginn.

3.4.4 Verlauf des Körpermengewichtes der einzelnen Tiere

	<u>Kontrolle</u>	<u>ALVD</u>	<u>CHF</u>	<u>ALVD+OMA</u>	<u>CHF+OMA</u>
<u>Verlauf Kg (kg)</u>	n.v.	$0,2 \pm 0,03$ n.s. (n=5)	$0,2 \pm 0,07$ n.s. (n=7)	n.v.	$-0,1 \pm 0,14$ n.s. (n=8)
* xxx: signifikant ($p < 0,05$) vs xxx					

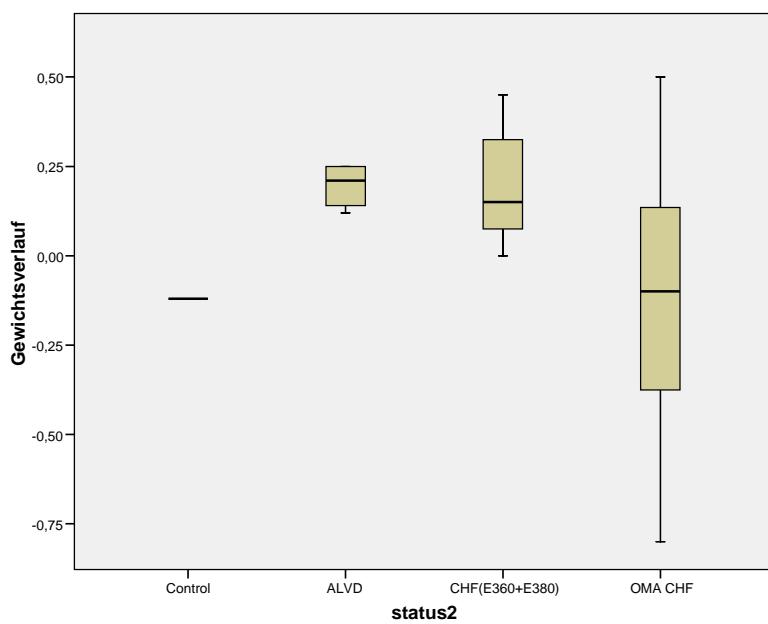
*xxx: Signifikanz ($p < 0,05$) im Vergleich zu xxx, n.s.: kein signifikanter Unterschied, n.v.: nicht verfügbar,

ALVD: asymptotische linksventrikuläre Dysfunktion, CHF: Congestive Heart Failure, +OMA: mit Omapatrilat behandelt, Verlauf KG

(kg): Verlauf des Körpermengewichtes der einzelnen Tiere in kg

Tabelle 3.4.4

Verlauf des Körpermengewichtes der einzelnen Tiere in kg mit Standardfehler im Verlauf der fortschreitenden Herzinsuffizienz sowie unter Omapatrilat.



Graphik 3.4.4

Verlauf des Körpergewichtes der einzelnen Tiere in kg im Verlauf der fortschreitenden Herzinsuffizienz sowie unter Omapatrilat

Im Verlauf der Herzinsuffizienz zeigt sich keine relevante oder signifikante Veränderung des Körpergewichtes der einzelnen Tiere.

3.5. Linksventrikuläre BNP-Expression

	<u>Kontrolle</u>	<u>ALVD</u>	<u>CHF</u>	<u>ALVD+OMA</u>	<u>CHF+OMA</u>
<u>BNP/</u> <u>GAPDH</u>	21,9 ±4,9 (n=5)	78,4 ±25,9 n.s. (n=5)	116,9 ± 27,1 * K, ALVD+OMA, (n=7)	15,59 ±2,98 * CHF, CHF+OMA (n=4)	63,86 ±17,0 *K, ALVD+OMA, (n=7)
* xxx: signifikant (p<0,05) vs xxx					

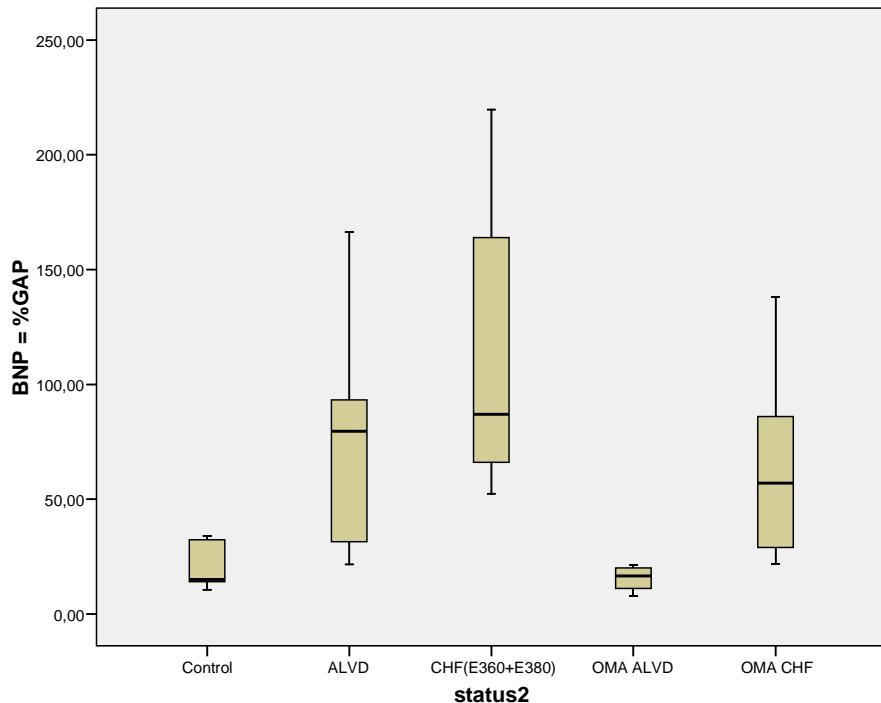
*xxx: Signifikanz (p<0,05) im Vergleich zu xxx, ALVD: asymptomatische linksventrikuläre Dysfunktion, CHF: Congestive Heart Failure, +OMA: mit Omapatrilat behandelt, BNP/GAPDH: BNP-Expression im Verhältnis zu GAPDH

Tabelle 3.5:

Expression von BNP im Verhältnis zu GAPDH mit Standardfehler im Verlauf der fortschreitenden Herzinsuffizienz sowie unter Omapatrilat

Im Stadium der asymptomatischen linksventrikulären Dysfunktion kommt es zu einem deutlichen, wenn auch nicht signifikanten Anstieg der BNP-Expression um 190%. Im weiteren Verlauf verdeutlicht sich diese Erhöhung der Expression signifikant (p=0,00) im Stadium der kongestiven Herzinsuffizienz um 530% im Vergleich zur Kontrolle und nicht signifikant im Vergleich zum Stadium der asymptomatischen linksventrikulären Dysfunktion um weitere 50%.

Unter Therapie mit Omapatrilat bleibt diese Entwicklung deutlich und signifikant hinter unbehandelten Tieren zurück. Im Stadium der asymptomatischen linksventrikulären Dysfunktion mit Omapatrilat kommt es sogar zu einem nicht-signifikanten Rückgang der BNP-Expression um 23% im Vergleich zu den Kontrolltieren. Im Stadium der kongestiven Herzinsuffizienz unter Omapatrilat zeigt sich zwar eine Steigerung der BNP-Expression um 290% im Vergleich zur Kontrolle, diese bleibt aber deutlich, wenn auch nicht signifikant, geringer im Vergleich zur unbehandelten kongestiven Herzinsuffizienz.



Graphik 3.5

Expression von BNP im Verhältnis zu GAPDH im Verlauf der fortschreitenden Herzinsuffizienz sowie unter Omapatrilat

3.6. Linksventrikuläre IL-6-Expression

	<u>Kontrolle</u>	<u>ALVD</u>	<u>CHF</u>	<u>ALVD+OMA</u>	<u>CHF+OMA</u>
<u>IL-6/GAPDH</u>	$2,34958 \cdot 10^{-3}$ ± 0,9 (n=5)	$8,57449 \cdot 10^{-3}$ ± 3,2 (n=5)	$16,52566 \cdot 10^{-3}$ ± 4,28 * n.s. (n=7)	$0,8187 \cdot 10^{-3}$ ± 0,05 * n.s. (n=3)	$35,06726 \cdot 10^{-3}$ ± 29,6 n.s., mit R102 (n=7)
* xxx: signifikant ($p < 0,05$) vs xxx					

*xxx: Signifikanz ($p < 0,05$) im Vergleich zu xxx, ALVD: asymptomatische linksventrikuläre Dysfunktion, CHF: Congestive Heart Failure, +OMA: mit Omapatrilat behandelt, IL-6: IL6-Expression im Verhältnis zu GAPDH

Tabelle 3.6.1:

Expression von IL-6 im Verhältnis zu GAPDH mit Standardfehler im Verlauf der fortschreitenden Herzinsuffizienz sowie unter Omapatrilat mit R102.

	<u>Kontrolle</u>	<u>ALVD</u>	<u>CHF</u>	<u>ALVD+OMA</u>	<u>CHF+OMA</u>
<u>IL-6/GAPDH</u>	$2,34958 \cdot 10^{-3}$ ± 0,9 (n=5)	$8,57449 \cdot 10^{-3}$ ± 3,2 n.s. (n=5)	$13,6232 \cdot 10^{-3}$ ± 5,7 * n.s. (n=7)	$0,8187 \cdot 10^{-3}$ ± 0,05 * n.s. (n=3)	$5,57947 \cdot 10^{-3}$ ± 2,6 n.s. ohne R102 (n=6)
	* xxx: signifikant ($p < 0,05$) vs xxx				

*xxx: Signifikanz ($p < 0,05$) im Vergleich zu xxx, ALVD: asymptomatische linksventrikuläre Dysfunktion, CHF: Congestive Heart Failure, +OMA: mit Omapatrilat behandelt, IL-6: IL6-Expression im Verhältnis zu GAPDH

Tabelle 3.6.2:

Expression von BNP im Verhältnis zu GAPDH mit Standardfehler im Verlauf der fortschreitenden Herzinsuffizienz sowie unter Omapatrilat ohne R102.

Im Verlauf der Herzinsuffizienz kommt es im Stadium der asymptomatischen linksventrikulären Dysfunktion zu einer nicht-signifikanten Steigerung der IL-6-Expression um 265%, im Stadium der kongestiven Herzinsuffizienz zu einem nicht signifikanten Anstieg auf 580% im Vergleich zur Kontrolle. Unter Therapie mit Omapatrilat stellt sich dieser Anstieg deutlich gemäßigt dar. Im Stadium der asymptomatischen linksventrikulären Dysfunktion unter Therapie kommt es zu einem nicht-signifikantem Abfall der IL-6-Expression um 65% im Vergleich zur Kontrolle. Im Stadium der kongestiven Herzinsuffizienz ist ein deutlicher, nicht signifikanter Anstieg der IL-6-Expression festzustellen, wobei dies vor allem durch einen einzelnen, abnorm erhöhten Wert unklarer Genese bei R102 (0,211994) zustande kommt. Bei Berechnungen ohne R102 zeigt sich im Stadium der kongestiven Herzinsuffizienz unter Therapie ein deutlich geringerer, nicht signifikanter Anstieg der IL-6-Expression auf 238% im Vergleich zur Kontrolle und liegt damit bei 41% im Vergleich zum Stadium der kongestiven Herzinsuffizienz ohne Behandlung mit Omapatrilat.

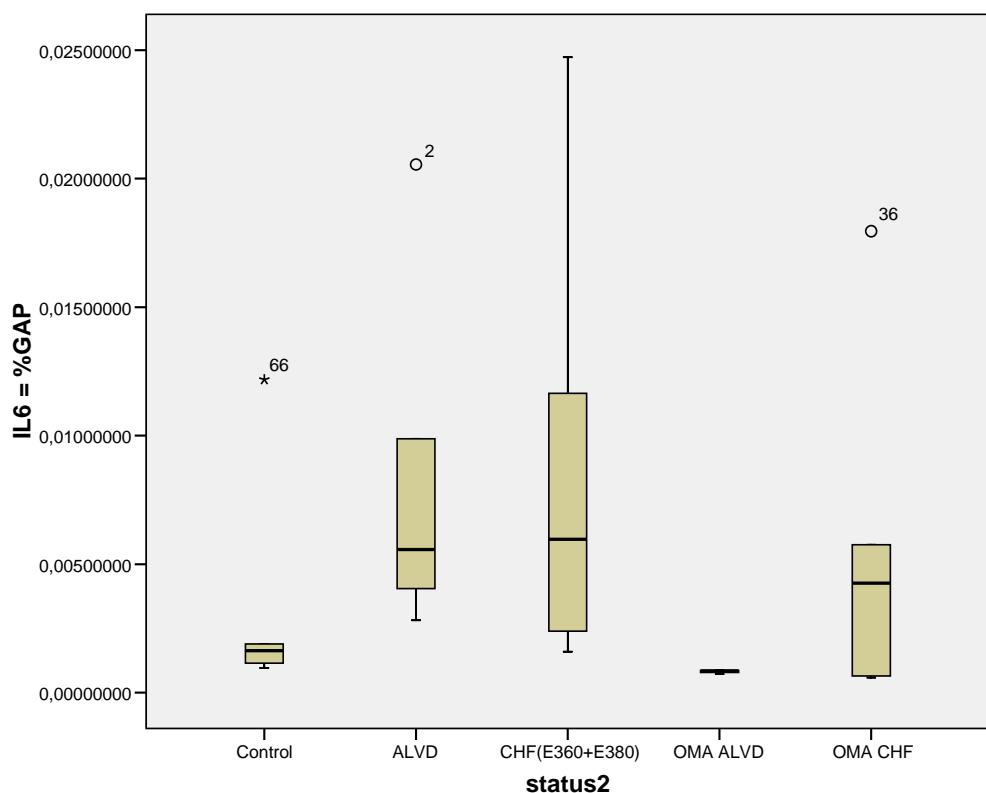


Abb. 3.6.1:

Expression von IL6 im Verhältnis zu GAPDH im Verlauf der fortschreitenden Herzinsuffizienz sowie unter Omapatrilat ohne R102.

4 Diskussion

Im Mittelpunkt dieser Studie lag die Entwicklung der linksventrikulären Genexpression von IL-6 und BNP, der Hämodynamik und kardialer Funktionsparameter im Verlauf einer experimentellen Herzinsuffizienz an Kaninchen sowie die Beeinflussung dieser Parameter durch kombinierte ACE- und NEP-Inhibition mittels Omapatrilat, einem Vasopeptidase-Inhibitor.

Wir wendeten dazu ein bereits etabliertes Kleintiermodell an, bei dem durch Schrittmacher-induzierte Tachykardie eine progrediente Herzinsuffizienz provoziert und in 2 Stufen, die asymptomatische linksventrikuläre Dysfunktion (ALVD) und die kongestive Herzinsuffizienz (CHF), unterteilt wurde.

Unter stufenweiser Steigerung der Herzfrequenz konnten im Stadium der ALVD und weiter im Stadium der CHF echokardiographisch eine deutliche und signifikante Minderung der linksventrikulären Ejektionsfraktion und eine signifikante Steigerung der linksventrikulären Wandspannung gemessen werden. Im Verlauf der progredienten Herzinsuffizienz war eine Zunahme des Körpergewichtes festzustellen, das linksventrikuläre Gewicht sowie der kardiale Masseindex nahmen ebenfalls zu, zeigten aber keine signifikante Veränderung im Verlauf der Herzinsuffizienz. Zusammen mit einer signifikanten Vergrößerung des linksventrikulären enddiastolischen Diameters sowie einer Verringerung des linksventrikulären posterioren Wanddurchmessers konnte man das klinische Bild als dekompensierte Herzinsuffizienz im Rahmen einer experimentell induzierten dilatativen Cardiomyopathie beschreiben.

4.1 BNP

Während dieser Entwicklungen war eine deutliche Steigerung der mRNA-Expression von BNP im linksventrikulären Herzmuskelgewebe mittels Realtime-PCR (Lightcycler) nachweisbar. Im Stadium der asymptomatischen Herzinsuffizienz kam es zu einem deutlichen, wenn auch statistisch nicht signifikanten Anstieg der BNP-Expression auf 358% im Vergleich zur Kontrolle. Im weiteren Verlauf der Herzinsuffizienz verdeutlicht sich diese Erhöhung der Expression signifikant ($p=0,00$) mit einem Anstieg von BNP-mRNA im Stadium der kongestiven Herzinsuffizienz um 530% im Vergleich zur Kontrolle, im Vergleich zum Stadium der asymptomatischen linksventrikulären Dysfunktion nicht signifikant um weitere 50%.

Unsere Ergebnisse stimmen mit vorhergehenden Studien überein (38, 41, 44), die eine signifikante Zunahme der linksventrikulären BNP-Expression mit zunehmender Schwere der Erkrankung parallel zur Verschlechterung der linksventrikulären Ejektionsfraktion aufzeigen. Auch der Schluss, dass die linksventrikuläre Wandspannung als der auslösende Stimulus der linksventrikulären BNP-Expression zu sehen ist (38, 39, 41, 42, 44, 50, 51, 84) wird durch die vorliegenden Daten unterstützt, da parallel zur BNP-Expression im Stadium der asymptomatischen linksventrikulären Herzinsuffizienz die linksventrikuläre Wandspannung signifikant erhöht ist. Im Stadium der kongestiven Herzinsuffizienz nimmt sie weiter zu, wie auch vorhergehenden Studien (38) signifikant. Dass BNP nicht nur experimentell in Tierversuchen, sondern auch im insuffizienten humanen Herzen parallel zur Progredienz der Herzinsuffizienz steigt, konnte mittlerweile nachgewiesen werden (41, 42). In der BNP-Studie (Breathing Not Properly) wurde gezeigt, dass eine einmalige Messung des BNP-Spiegels zum Zeitpunkt der Aufnahme in der Klinik mit akuter Atemnot eine höhere diagnostische Genauigkeit aufwies, als sämtliche von den Ärzten veranlassten Untersuchungen wie Anamnese, körperliche Untersuchung, konventionelles Labor und Röntgen Thorax (41, 42, 89).

Im Rahmen des Akuten Koronarsyndroms ist BNP ebenfalls von hohem prognostischem Wert hinsichtlich des Risikos für linksventrikuläres Remodeling, Herzinsuffizienz und Tod (42, 44, 84). In einer weiteren großen Studie mit 452 Patienten mit einer linksventrikulären Ejektionsfraktion kleiner 35% differenzierte der BNP-Spiegel bei einem Grenzwert von 130pg/ml gut zwischen Patienten mit hohem und Patienten mit niedrigem Risiko eines plötzlichen Herztodes (42). Diese prognostische Bedeutung des BNP für Morbidität und Mortalität konnte in mehreren Studien bestätigt werden (31, 41, 44, 76, 84).

Auch zur Bewertung einer suffizienten Herzinsuffizienztherapie scheint die BNP-Konzentration aussagekräftig, da sie bei effektiver Therapie mit Diuretika und Vasodilatatoren gemeinsam mit den intrakardialen Füllungsdrücken sinkt (44).

Alles in allem scheint BNP ein hervorragender prognostischer Parameter für Morbidität und Mortalität bei herzinsuffizienten Patienten zu sein und wird bereits in einigen Kliniken zur Differenzierung bei Dyspnoe unklarer Genese angewandt.

In einer neuen Studie wurde jedoch der Verdacht geäußert, nach einem parallel zur Herzinsuffizienz verlaufendem Anstieg von BNP könne bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz im Endstadium ein präfinaler Abfall des BNP-Spiegels aufgrund einer Erschöpfung des neurohormonalen Systems oder aufgrund einer Up-Regulation der neutralen

Endopeptidase auftreten (76). Diese Feststellung benötigt sicher weitere Beobachtungen und legt die kritische Anwendung des BNP-Spiegel nahe.

4.2 IL-6

Wie bei BNP konnten wir auch für Interleukin-6 im Verlauf der Herzinsuffizienz einen Anstieg der linksventrikulären Genexpression indirekt proportional zur linksventrikulären Pumpfunktion nachweisen. Im Stadium der asymptomatischen linksventrikulären Pumpfunktion kam es zu einer nicht signifikanten Erhöhung des IL-6-Spiegels um 265% im Vergleich zur Kontrolle, im weiteren Verlauf steigerte sich die IL-6-Expression im Stadium der kongestiven Herzinsuffizienz nicht signifikant um 340% im Vergleich zur Kontrolle. Dabei korreliert IL-6 mit einer reduzierten linksventrikulären Kontraktilität, einem erhöhtem linksventrikulären enddiastolischen Diameter und einer erhöhten linksventrikulären enddiastolischen Wandspannung im Sinne einer erhöhten Vorlast sowie mit erniedrigten Blutdruckwerten im Sinne einer reduzierten Nachlast, wie auch in vorhergehenden Studien beschrieben (59, 60). Mit dem gemessenen Anstieg der IL-6-Expression stimmen wir mit den meisten bereits veröffentlichten Studien überein (31, 60, 59, 78, 79, 81, 82) und widersprechen einigen Studien, die bei linksventrikulärer Dysfunktion keinen Anstieg der mRNA-Expression für IL-6 in kardialem Herzmuskelgewebe beschreiben, sondern lediglich eine gesteigerte pulmonale IL-6-Expression bestätigen. Wo die Expression von IL-6 stattfindet, aus welchem kardialen Gewebe, ob aus Muskelgewebe, Bindegewebe oder sonstigen Gewebearten IL-6 freigesetzt wird, kann in diesem Versuch allerdings nicht differenziert werden.

Im Gegensatz zu BNP ist IL-6 jedoch nicht Teil einer Kompensationsreaktion des Körpers bei erhöhter linksventrikulärer Wandspannung. Vielmehr stellt sich die Frage, ob erhöhte IL-6-Spiegel Teil der zur Herzinsuffizienz führenden pathophysiologischen Abläufe oder eine indirekte Folge der Herzinsuffizienz sind.

Dabei ist für IL-6 eine kardiotoxische Wirkung beschrieben (82) mit negativ inotropen Effekten auf kardiale Myozyten (59, 79, 81), ebenso wie die Förderung der Hypertrophie kardialer Myozyten mit direktem Einfluss auf linksventrikuläres Remodeling (60, 79) und Abnahme myokardialer Masse mit Verlust kardialen Actins (81). Diese beschriebenen Wirkungen legen die Vermutung nahe, dass IL-6 als Teil der Pathophysiologie zur Entstehung der Herzinsuffizienz beiträgt. Neben der Herzinsuffizienz ist eine Erhöhung von IL-6 auch im Rahmen von Schlaganfällen und koronarer Herzerkrankung mit Destabilisation und Aufbrechen von Plaques sowie vaskulärem Remodeling (78) beschrieben.

Wie bei BNP so wird in Einklang mit unseren Ergebnissen auch die prognostische Aussagekraft des IL-6-Spiegels für Morbidität und Mortalität in bereits veröffentlichten Studien hoch eingestuft (60, 78, 79, 80). So konnte in der Health-ABC-Studie bei erhöhten Zytokinspiegeln eine deutlich erhöhte Inzidenz kongestiver Herzinsuffizienz, koronarer Herzkrankheit sowie von Schlaganfällen nachgewiesen werden. IL-6 zeigte sich dabei als stärkster und beständigster Indikator kardiovaskulärer Ereignisse (78). In Übereinstimmung dazu konnte IL-6 in der Framingham Heart Studie als zuverlässiger und kontinuierlich ansteigender Parameter für chronische Herzinsuffizienz bestätigt werden (79). Im klinischen Alltag spielt die Bestimmung des IL-6 Spiegels im Gegensatz zu BNP jedoch derzeit noch keine Rolle.

4.3 Vasopeptidase-Inhibition

Neben den Verläufen der Expression von BNP und IL-6 wurden in unseren Versuchen auch die Auswirkung von Omapatrilat, einem Vasopeptidase-Inhibitor, auf den Verlauf der Herzinsuffizienz und auf die Expression von BNP und IL-6 untersucht.

Dabei konnte die vermutete kardioprotektive Wirkung von Omapatrilat bestätigt werden.

Die im Verlauf der Herzinsuffizienz progrediente und signifikante Verringerung der linksventrikulären Verkürzungsfaktion um 40% war unter Behandlung mit Omapatrilat zwar nicht zu verhindern. Die bei kongestiver Herzinsuffizienz gemessene signifikante Zunahme der linksventrikulären systolischen Wandspannung jedoch fiel bei mit Omapatrilat behandelten Tieren deutlich und signifikant geringer aus, wie auch in vorhergehenden Studien berichtet (66, 70). Die Zunahme des linksventrikulären enddiastolischen Diameters konnte unter Omapatrilat nur im Stadium der asymptomatischen Herzinsuffizienz vermieden werden, im Stadium der kongestiven Herzinsuffizienz kam es wie in der unbehandelten Gruppe zu einer Zunahme des enddiastolischen Diameters. Dennoch war in diesem Stadium eine reduzierte linksventrikuläre systolische Wandspannung, geringere Zunahme der linksventrikulären Masse sowie eine unter Omapatrilat zu beobachtende geringere Abnahme des linksventrikulären posterioren Wanddurchmessers zu beobachten. Klinisch kam es zu einer deutlichen und signifikanten Reduktion des Körpergewichtes, was für eine bessere Kompensation auch unter dem diuretischen Effekt der Vasopeptidase-Inhibitoren spricht. Auch die rückläufige Entwicklung des Körpergewichts der einzelnen Tiere unter Omapatrilat belegt die diuretische Wirkung der VPI. Die Erhöhung des linksventrikulären Masseindex dürfte dabei verfälscht werden durch die Abnahme des Körpergewichtes bei nur geringer Anstieg linksventrikulärer Masse und niedriger Fallzahl der Versuchstiere (n=8). Als Indiz

einer linksventrikulären Hypertrophie kann dies nicht gewertet werden. Bezieht man die Entwicklung des linksventrikulären Gewichtes statt auf das Körpergewicht zum Zeitpunkt der Sectio auf das Körpergewicht zu Versuchsbeginn (KG BL), so kann man den Verlauf des linksventrikulären Gewichtes unverfälscht durch die Veränderungen des Körpergewichtes im Verlaufe des Versuches beobachten. Hier erkennt man einen geringeren Anstieg des Masseindex bei den behandelten Tieren und somit einer verminderten Hypertrophie.

Unter VPI konnte vor allem im Stadium der ALVD eine deutliche und zumindest bezüglich der Urinnatrium- und Kaliumkonzentrationen signifikante Steigerung der Natrium- und Kaliumausscheidung gemessen werden, welche im Stadium der CHF allerdings sogar auf Werte unterhalb der Kontrollgruppe zurückging. Dies lies sich auch tendenziell bei der 24Stunden-Natrium- und Kaliumausscheidung gemessen werden. Die Messungen der Diurese und Elektrolytausscheidung waren allerdings so inhomogen und nicht signifikant, dass daraus kein relevanter Rückschluss gezogen werden kann. Bezüglich der Diurese kann zumindest aus dem rückläufigen Verlauf des Körpergewichts der einzelnen Tiere auf einen diuretischen Effekt der VPI geschlossen werden.

Vor allem bei der Expression der oben beschriebenen Parameter, BNP und IL-6, kommt es entsprechend der geminderten linksventrikulären systolischen Wandspannung zu einem deutlichen Rückgang unter Behandlung mit Omapatrilat. Im Stadium der kongestiven Herzinsuffizienz zeigt sich unter Therapie ein deutlich geringerer, nicht signifikanter Anstieg der IL-6-Expression auf 238% im Vergleich zur Kontrolle und ist damit um ca.60% reduziert im Vergleich zum Stadium der kongestiven Herzinsuffizienz ohne Behandlung mit Omapatrilat.

Auch bei der Expression von BNP bleibt der im Verlauf der Herzinsuffizienz signifikante Anstieg unter Therapie mit Omapatrilat deutlich und signifikant mit 55% im Vergleich zur unbehandelten kongestiven Herzinsuffizienz hinter unbehandelten Tieren zurück. Dies bestätigt einerseits die kardioprotektive Wirksamkeit von Omapatrilat, andererseits auch die Aussagekraft der beiden Parameter, IL-6 und BNP. Dabei ist zu erwähnen, dass in unserem Modell der Rückgang der Genexpression von BNP im Myokard bestimmt wurde; die Menge im Kreislauf zirkulierender und wirksamer natriuretischer Peptide dürfte vermutlich bei bestehender Herzinsuffizienz allerdings eher erhöht sein durch den verminderten Abbau über die neutrale Endopeptidase unter Omapatrilat. Hierfür existieren aber keine spezifischen Assays für Kaninchen.

Auch hier stehen unsere Ergebnisse in Übereinstimmung mit vorhergehenden Untersuchungen (66, 67, 68, 70, 73). Zur Bestätigung der klinischen Wirksamkeit von

Omapatrilat und zum Vergleich mit ACE-Hemmern wurden die klinischen Studien IMPRESS mit Lisinopril und OVERTURE mit Enalapril durchgeführt.

Während bei IMPRESS leichte Vorteile von Omapatrilat gegenüber Lisinopril bezüglich Morbidität und Mortalität, jedoch eine ausbleibende Verbesserung der Belastbarkeit postuliert wurden (69), zeigte sich bei OVERTURE keine höhere Effektivität als bei Enalapril, das Risiko primärer klinischer kardialer Ereignisse zu verhindern (83). Betrachtet man alle kardiovaskulären Ereignisse schien Omapatrilat allerdings auch hier einen leichten Vorteil zu bringen (83). Vor allem bei hypertensiven Patienten und Patienten mit noch nicht maximal eingeschränkter Ejektionsfraktion ($EF > 0,23$) ließ sich ein Benefit unter Omapatrilat nachweisen. Patienten mit erhöhten Blutdruckwerten sprachen auf Omapatrilat besser an als auf Enalapril. Je niedriger der Blutdruck, desto geringer war allerdings der Vorteil von Omapatrilat. In der OVERTURE-Studie wurden eventuelle Verbesserungen der Wirksamkeit durch Modifikation der Dosierung, wie zum Beispiel die zweimalige Gabe pro Tag zur Aufrechterhaltung der Wirkung diskutiert. Ein weiterer Vorteil der Vasopeptidase-Inhibitoren liegt in einer stärkeren Nephroprotektion (67, 66, 70, 69, 83).

In Anbetracht unserer Ergebnisse sowie anderen experimentellen Untersuchungen schienen die Vasopeptidase-Inhibitoren eine echte Alternative bei der Behandlung der Herzinsuffizienz sowie der arteriellen Hypertension darzustellen. Allerdings zeigte sich in der klinischen Anwendung eine deutliche Diskrepanz zwischen experimentellen Schlüssen und den Erfahrungen der klinischen Anwendung. Experimentell zeigten sich die Vasopeptidase-Inhibitoren gut wirksam. In der klinischen Anwendung waren aber die Risiken bezüglich der Nebenwirkungen, vor allem Angioödeme, deutlich erhöht und limitieren somit den Einsatz der Vasopeptidase-Inhibitoren. Eine mögliche Indikation wären vielleicht einige Subkollektive der Herzinsuffizienzpatienten, wie Patienten mit zusätzlicher arterieller Hypertonie, einem frühen Stadium der kongestiven Herzinsuffizienz oder Niereninsuffizienz.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde in einem Kleintiermodell mittels Schrittmacher-induzierter Tachykardie eine Herzinsuffizienz schrittweise provoziert. Ziel war es dabei einerseits, die kardiale Expression von IL-6 und BNP im Verlauf der Herzinsuffizienz hinsichtlich der Tauglichkeit als Biomarker einer Herzinsuffizienz zu untersuchen. Außerdem war es Ziel dieser Arbeit, die Auswirkungen einer Therapie mit Vasopeptidase-Inhibitoren, in diesem Fall Omapatrilat, auf die klinische Entwicklung der Herzinsuffizienz und die Auswirkungen der Expression von IL-6 und BNP zu untersuchen.

Hierbei konnte entsprechend den bereits veröffentlichten Studien eine prognostische Relevanz der linksventrikulären Expression von BNP bezüglich der Schwere einer Herzinsuffizienz sowie des Verlaufes unter einer entsprechenden Therapie bestätigt werden. Einschränkend müssen ein möglicher präfinaler Abfall der BNP-Expression sowie weitere den Plasmaspiegel des BNP beeinflussenden Faktoren erwähnt werden. Dies legt eine differenzierte Interpretation erhöhter BNP-Spiegel nahe. Ein unauffälliger BNP-Spiegel dagegen ist bei der hohen Sensitivität ein starkes Indiz einer nicht-kardialen Genese etwaiger Symptome.

Auch für IL-6 konnte die prognostische Aussagekraft bezüglich Morbidität und Mortalität bestätigt werden, da in unserer Arbeit mit zunehmender Herzinsuffizienz auch die linksventrikuläre IL-6-Genexpression entsprechend anstieg. Auch hier muss einschränkend erwähnt werden, dass nicht nur bei Herzinsuffizienz, sondern auch bei koronarer Herzerkrankung und Schlaganfällen, also vaskulären Ereignissen erhöhte IL-6-Spiegel gemessen werden konnten.

Bezüglich der Auswirkungen einer Therapie mit Vasopeptidase-Inhibitoren auf die klinische Entwicklung der Herzinsuffizienz und die Auswirkungen der Expression von IL-6 und BNP konnte in dieser experimentellen Untersuchung ein sehr guter kardioprotektiver Effekt beschrieben werden mit Verbesserungen der Klinik, kardialer Funktionsparameter sowie deutlicher Reduktion der Genexpression von IL-6 und BNP. Dennoch besteht eine Diskrepanz zwischen experimentellen Ergebnissen wie diesem und den Erfahrungen der klinischen Anwendung. Vor allem das erhöhte Auftreten von Nebenwirkungen wie Angioödeme limitiert den Einsatz dieser Medikamente.

6. Limitationen

Bei der Bewertung der Ergebnisse dieser Arbeit müssen einige Limitationen beachtet werden. Zum einen beruhen die statistischen Ergebnisse auf relativ geringen Fallzahlen und sind somit mit einer relativ hohen Ungenauigkeit behaftet.

Zum anderen konnte bei der Bestimmung der Genexpression von IL-6 und BNP und deren Bedeutung kein Vergleich zur entsprechenden Plasmakonzentration gezogen werden, da für Kaninchen keine spezifischen Assays existieren.

Auch konnten wir, wie in der Diskussion bereits beschrieben, zwar die Genexpression von IL-6 und BNP im Myokard des linken Ventrikels nachweisen. Die genaue Quelle der Genexpression, ob Myozyten, Neuromuskuläres Gewebe oder Bindegewebe, konnten wir aber nicht differenzieren.

7. Danksagung

Um diese Promotionsarbeit zu einem Abschluss zu bringen nahm ich dankbar viel Hilfe von verschiedenen Seiten an.

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater und Betreuer in Personalunion, Herrn Prof. Dr. A. Luchner, für die Überlassung des Themas, die fachliche Hilfe, Nutzung der Laboreinrichtungen und die Geduld danken.

Außerdem danke ich den wissenschaftlichen Mitarbeitern der 2. Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Regensburg für die tatkräftige und konstruktive Hilfe, namentlich Herrn Dr. C. Ulucan sowie meinen Co-Doktoranden M. Bratfisch und Dr. O. Dietl für die Vorarbeit. Ebenso gilt mein Dank den Mitarbeitern des Labors der 2. Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Regensburg, allen voran Frau A. Deschler für die Einweisung in Material und technische Methoden sowie die persönliche Unterstützung.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Frau und meinen Eltern für die Geduld, sowie meinem Vater für die Hilfe unterschiedlichster Art danken.

C u r r i c u l u m v i t a e

Persönliche Angaben

Name: Tobias Christian Felix GÖTZ
Geburtsdatum und – ort: 21.10.1975, Regensburg
Eltern: Dr. Peter und Elfriede Götz
Familienstand: verheiratet

Schulbildung

1982 – 1986 Grundschule in Regen
1986 – 1995 Gymnasium in Zwiesel
30. 06. 1995 Abschluss mit allgemeiner Hochschulreife

Ausbildung

01.1996 Prüfung zum Rettungssanitäter
01. 1997 – 25.03. 1997 Weiterbildung zum Rettungsassistenten an der
Rettungsdienstschule Werdau
16. 05. 1997 Abschluss mit staatlicher Prüfung

Studium

Seit 10. 1997 Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg
03. 2000 Ärztliche Vorprüfung
03. 2001 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03. 2003 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04.2004 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
26.04.2004 Erteilung der Erlaubnis für die Tätigkeit als Arzt im Praktikum
01.10. 2004 Erteilung der Approbation

Arbeitsverhältnis

17.05. 2004 – 01.10. 2004	Arzt im Praktikum in der 2. Medizinischen Abteilung des Klinikum St. Elisabeth in Straubing
01.10. 2004 – 16.10.2005	Assistenzarzt in der 2. Medizinischen Abteilung des Klinikum St. Elisabeth in Straubing
Seit 01.11.2005	Assistenzarzt in der 1. Medizinischen Abteilung des Klinikums Deggendorf

Studienbegleitende Tätigkeiten

Seit 1995	Rettungsdienst, Malteser Hilfsdienst Regensburg
2000 - 2004	Semestersprecher / PJ-Sprecher
Seit 2001	Experimentelle Arbeit zur Dissertation; Thema: Expression von IL-6 und BNP bei Herzinsuffizienz und Beeinflussung durch Omapatrilat (Vasopeptidase-Inhibitor)

Zivildienst

09. 1995 – 09. 1996	Rettungsdienst des Malteser Hilfsdienstes Regensburg
---------------------	--

Deggendorf, 01.10.2008

Literaturverzeichnis

- (1) John J McMurray, Simon Stewart
Epidemiology, aetiology and prognosis of heart failure
Heart 2000, 83:596-602
- (2) M.R. Cowie, A.Mosterd, D.a. Wood, J.W. Deckers, P.A. Poole-Wilson, G.C. Sutton and D.E. Grobbee
The epidemiology of heart failure
Eur Heart J (1997) 18, 208-225
- (3) G. M. Felker, K.F. Adams, M.A. Konstam, C.M. O'Connor, M.Gheorghiade
The problem of decompensated heart failure: Nomenclature, classification, and risk stratification
Am Heart J, Volume 145, 2: S18-S25
- (4) K.F. Adams, F. Zannad
Clinical definition and epidemiology of advanced heart failure
Am Heart J, Volume 135, 6 Part 2: S204-S214
- (5) I.F. Purcell, P.A. Poole-Wilson
Heart failure: why and how to define it ?
Eur J heart fail (1999) 7-17
- (6) M.R. Cowie, D.A. Wood, A.J.S. Coats, S.G. Thompson, P.A. Poole-Wilson, V. Suresh, G.c. Sutton
Incidence and aetiology of heart failure; a population based study
Eur Heart J (1999) 20, 421-428
- (7) H. Schirmer, P. Lunde, K. Rasmussen
Prevalence of left ventricular hypertrophy in a general population;
Eur Heart J (1999) 20, 429-438
- (8) A. Bruns, G.-H. Reil
Herzinsuffizienz
Thiemes Innere Medizin
- (9) A.A. Louis
The Heart Failure Journal Club: a review of publications on Heart Failure in the European Heart Journal
Eur J Heart Fail 4 (2002) 105-109
- (10) The Consensus Trial Study Group
Effects of Enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (Consensus)
N Eng J Med 316(1987): 1429-35
- (11) F. Muders, D. Elsner
Animal models of chronic heart failure

- (12) D.W. Baker, R.C. Bahler, R.S. Finkelhor, M.S. Laurer
Screening for left ventricular systolic dysfunction among patients with risk factors for heart failure
Am Heart J 2003; 146: 736-40
- (13) R. Kerzner, B.F. Gage, K.E. Freeland, M.W. Rich
Predictors of mortality in younger and older patients with heart failure and preserved or reduced left ventricular ejection fraction
Am Heart J 2003; 146:286-90
- (14) E.F. Lewis, L.A. Moye, J.L. Rouleau, F.M. Sacks, J.M.O. Arnold, J.W. Warnica, G.C. Flaker, E. Braunwald, M.A. Pfeffer
Predictors of Late Development of Heart Failure in Stable Survivors of Myocardial Infarction
The CARE Study
J Am Coll Cardiol 2003; Vol.42, 8: 1446-53
- (15) M.A. Pfeffer
Cardiac Function and Heart Failure
J Am Coll Cardiol 2003; Vol. 42, 2: 375-93
- (16) G.M. Felker, L.K. Shaw, C.M. O'Connor
A Standardized Definition of Ischemic Cardiomyopathy for Use in Clinical Research
J Am Coll Cardiol 2002; Vol. 39, 2: 210-8
- (17) P.A. McCullough, E.F. Philbin, J.A. Spertus, S. Kaatz, K.R. Sandberg, W.D. Weaver
Confirmation of a Heart Failure Epidemic: Findings From the Resource Utilization Among Congestive Heart Failure (REACH) Study
J Am Coll Cardiol 2002; Vol. 39, 1: 60-9
- (18) C.T.C. Lien, N.D. Gillespie, A.D. Struthers, M.E.T. McMurdo
Heart failure in frail elderly patients: diagnostic difficulties, co-morbidities, polypharmacy and treatment dilemmas
Eur J Heart Fail 4 (2002) 91-98
- (19) B. Greenberg, C. Borghi, S. Perrone
Pharmacotherapeutic approaches for decompensated heart failure: a role for the calcium sensitiser, levosimendan?
Eur J Heart Fail 5 (2003) 13-21
- (20) A.-Y. Chong, R. Rajaratnam, N.-R. Hussein, G.Y.H. Lip
Heart failure in a multiethnic population in Kuala Lumpur, Malaysia
Eur J Heart Fail 5 (2003) 569-574
- (21) T.J. Wang, J.C. Evans, E.J. Benjamin, D. Levy, E.C. LeRoy, R.S. Vasan
Natural History of Asymptomatic Left Ventricular Systolic Dysfunction in the Community
Circulation 2003; 108: 977-982

- (22) M. Frigerio
 Prevention and Management of Chronic Heart Failure in Management of Asymptomatic Patients
Am J Cardiol 2003; 91 (suppl): 4F-9F
- (23) L. Dei Cas, M. Metra, S. Nodari, A. Dei Cas, M. Gheorghiade
 Prevention and Management of Chronic Heart Failure in Patients at Risk
Am J Cardiol 2003; 91 (suppl): 10F-17F
- (24) L. Klein, C.M. O'Connor, W.A. Gattis, M. Zampino, L. De Luca, A. Vitarelli, F. Fedele, M. Gheorghiade
 Pharmacologic Therapy for Patients with Chronic Heart Failure and Reduced Systolic Function: Review of Trials and Practical Considerations
Am J Cardiol 2003; 91 (suppl): 18F-40F
- (25) P. Colonna, M. Sorino, C. D'Agostino, F. Bovenzi, L. de Luca, F. Arrigo, I. de Luca
 Nonpharmacologic Care of Heart Failure : Counseling, Dietary Restriction, Rehabilitation, Treatment of Sleep, Apnea, and Ultrafiltration
Am J Cardiol 2003; 91(suppl): 41F-50F
- (26) W. Rutishauser, O. Hess, W. Siegenthaler
 Klinische Pathophysiologie von Herz und Koronarkreislauf
 Thieme, Klinische Pathophysiologie
- (27) A. Deswal, N.J. Petersen, A.M. Feldman, J.B. Young, B.G. White, D.L. Mann
 Cytokines and Cytokine Receptors in Advanced Heart Failure
Circulation 2001; 103: 2055-2059
- (28) F.A. Recchia, R.D. Bernstein, P.B. Sehgal, N.R. Ferreri, T.H. Hintze
 Cytokines Are Not a Requisite Part of the Pathophysiology Leading to Cardiac Decompensation
P.S.E.B.M. 2000, Vol. 223: 47-50
- (29) L. Gullestad, P. Aukrust, T. Ueland, T. Espevik, G. Yee, R. Vagelos, S.S. Froland, M. Fowler
 Effect of High- Versus Low-Dose Angiotensin Converting Enzyme Inhibition on Cytokine Levels in Chronic Heart Failure
J Am Coll Cardiol 1999; 34: 2061-7
- (30) Z. Dibbs, J. Thornby, B.G. White, D.L. Mann
 Natural Variability of Circulating Levels of Cytokines and Cytokine Receptors in Patients With Heart Failure: Implications for Clinical Trials
J Am Coll Cardiol '99; 33: 1935-42
- (31) K. Maeda, T. Tsutamoto, A. Wada, N. Mabuchi, M. Hayashi, T. Tsutsui, M. Ohnishi, M. Sawaki, M. Fujii, T. Matsumoto, M. Kinoshita
 High Levels of Plasma Brain Natriuretic Peptide and Interleukin-6 After Optimized Treatment for Heart Failure Are Independent Risk Factors for Morbidity and Mortality in Patients With Congestive Heart Failure
J Am Coll Cardiol 2000; 36: 1587-93

- (32) H. Persson, K. Andréasson, T. Kahan, S.V. Eriksson, B. Tidgren, P. Hjemdahl, C. Hall, L. Erhardt
 Neurohumoral activation in heart failure after acute myocardial infarction treated with beta-receptor antagonists
Eur J Heart Fail 2002; 4: 73-82
- (33) M. Cesari, B.W.J.H. Penninx, A.B. Newman, S.B. Kritchewsky, B.J. Nicklas, K. Sutton-Tyrrell, R.P. Tracy, S.M. Rubin, T.B. Harris, M. Pahor
 Inflammatory Markers and Cardiovascular Disease (The Health, Aging and Body Composition Study)
Am J Cardiol 2003; 92: 522-528
- (34) Am J Cardiol 1999; 83 (2A): 1A-36A
- (35) M. Senni, C.M. Tribouilloy, R.J. Rodeheffer, S.J. Jacobsen, J.M. Evans, K.R. Bailey, M.M. Redfield
 Congestive Heart Failure in the Community
Circulation 1998; 98: 2282-2289
- (36) J.C. Gottdiener, R.L. McClelland, R. Marshall, L. Shemanski, C.D. Furberg, D.W. Kitzmen, M. Cushman, J. Polak, J.M. Gardin, B.J. Gersh, G.P. Aurigemma, T.A. Manolio
 Outcome of Congestive Heart Failure in Elderly Persons: Influence of Left Ventricular Systolic Function
Ann Intern Med. 2002; 137: 631-639
- (37) R.S. Vasan, M.G. Larson, E.J. Benjamin, J.C. Evans, C.K. Reiss, D. Levy
 Congestive Heart Failure in Subjects With Normal Versus Reduced Left Ventricular Ejection Fraction
J Am Coll Cardiol 1999; 33:1948-1955
- (38) A.Luchner, F.Muders, O.Dietl, E.Friedrich, F.Blumberg, A.A. Protter, G.A.J.Riegger, D.Elsner
 Differential expression of cardiac ANP and BNP in a rabbit model of progressive left ventricular dysfunction
Cardiovasc Research 51 (2001) 601-607
- (39) A.Luchner, J.C.Burnett Jr, M.Jougasaki, H.-W.Hense, I.M.Heid, F.Muders, G.A.J.Riegger, H.Schunkert
 Evaluation of brain natriuretic peptide as marker of left ventricular dysfunction and hypertrophy in the population
J Hypertension 2000, 18:1121-1128
- (40) H.M.E.Azzazy, R.H.Christenson
 B-Type Natriuretic Peptide: Physiologic Role and Assay Characteristics
Heart Failure Reviews, 8 (2003): 315-320
- (41) A.S. Maisel

The Diagnosis of Acute Congestive Heart Failure: Role of BNP Measurements
Heart Failure Reviews, 8 (2003): 327-334

- (42) P.A.McCullough, T.Omland, A.S.Maisel
B-Type Natriuretic Peptides: A Diagnostic Breakthrough for Clinicians
Re Cardiovasc Med. 2003;4(2):72-80
- (43) A.Luchner, T.L.Stevens, D.D.Borges, M.Redfield, C.-M.Wei, J.G.Porter,
J.C.Burnett Jr.
Differential atrial and ventricular expression of myocardial BNP during evolution of
heart failure
Am J Physiol 274 (1998): H1684-H1689
- (44) J.A.de Lemos, D.K. McGuire, M.H.Drazner
B-type natriuretic peptide in cardiovascular disease
Lancet 2003; 362: 316-22
- (45) M. Jougasaki, H.Leskinen, A.M.Larsen, A.Luchner, A.Cataliotti, I.Tachibana,
J.C.Burnett Jr.
Ventricular cardiotrophin-1 activation precedes BNP in experimental heart failure
Peptides 24 (2003) 889-892
- (46) Y.Koseki, J.Watanabe, T.Shinozaki, M.Sakuma, T.Komaru, M.Fukuchi, M.Miura,
A.Karibe, Y.Kon-no, H.Numaguchi, M.Ninomiya, Y.Kagaya, K.Shirato
Characteristics and 1-Year Prognosis of Medically Treated Patients With Chronic
Heart Failure in Japan – Chronic Heart Failure Analysis Registry in Tohoku District
Circ J 2003;67:431-436
- (47) T.A.McDonagh, S.D.Robb, D.R.Murdoch. J.J. Morton, I.Ford, C.E.Morrison,
H.Tunstall-Pedoe, J.J.V.McMurray, H.J.Dargie
Biochemical detection of left-ventricular systolic dysfunction
Lancet 1998;351:9-13
- (48) K.Yamamoto, J.C.Burnett Jr., M.M.Redfield
Effect of endogenous natriuretic peptide system on ventricular and coronary function
in failing heart
Am J Physiol 273: H2406-H2414
- (49) S.J.Holmes, E.A.Espiner, A.M.Richards, T.G.Yandle, C.Frampton
Renal, Endocrine, and Hemodynamic Effects of Human Brain Natriuretic Peptide in
Normal Man
JCE&M, 1993;76,1:91-96
- (50) A.Luchner, D.D.Borges, J.A.Grantham, E.Friedrich, G.A.J.Rieger, J.C.Burnett Jr,
M.M.Redfield
Relationship between left ventricular wall stress and ANP gene expression during the
evolution of rapid ventricular pacing-induced heart failure in the dog
Eur J Heart Fail 2(2000)379-386
- (51) J.Ishii, M.Nomura, M.Ito, H.Naruse, Y.Mori, J.-h. Wang, T.Ishikawa, H.Kurokawa,
T.Kondo, Y.Nagamura, K.Ezaki, Y.Watanabe, H.Hishida

Plasma concentration of brain natriuretic peptide as a biochemical marker for the evaluation of right ventricular overload and mortality in chronic respiratory disease
Clinica Chimica Acta 301 (2000) 19-30

- (52) M.E.Hystad, R.Klinge, A.Spurkland, H.Attramadal, C.Hall
Contrasting cardiac regional responses of A-type and B-type natriuretic peptide to experimental chronic heart failure
Scand J Clin Lab Invest 2000; 60:299-310
- (53) R.W.Troughton, C.M.Frampton, T.G.Yandle, E.A.Espiner, M.G.Nicholls, A.M.Richards
Treatment of heart failure guided by plasma aminoterminal brain natriuretic peptide (N-BNP) concentrations
Lancet (2000), 355:1126-30
- (54) A.M.Richards, M.G.Nicholls, T.G. Yandle, C.Frampton, E.A.Espiner, J.G.Turner, R.C.Buttimore, J.G.Lainchbury, J.M.Elliott, H.Ikram, I.G.Crozier, D.W.Smyth
Plasma N-Terminal Pro-Brain Natriuretic Peptide and Adrenomedullin
Circulation 1998;97:1921-1929
- (55) W.S.Colucci, U.Elkayam, D.P.Horton, W.T.Abraham, R.C.Bourge, A.D.Johnson, L.E.Wagoner, M.M.Givertz, C.-S.Liang, M.Neibaur, H.Haught, T.H.LeJemtel
Intravenous Nesiritide, A Natriuretic Peptide, In The Treatment of Decompensated Congestive Heart Failure
N Engl J Med 2000;343:246-53
- (56) A.Luchner, M.Jougasaki, E.Friedrich, D.D.Borges, T.L.Stevens, M.M.Redfield, G.A.J.Rieger, J.C.Burnett,Jr
Activation of cardiorenal and pulmonary tissue endothelin-1 in experimental heart failure
Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol 279: R974-R979, 2000
- (57) N.Nagaya, M.Ando, H.Oya, Y.Ohkita, S.Kyotani, F.Sakamaki, N.Nakanishi
Plasma Brain Natriuretic Peptide as a Noninvasive Marker for Efficacy of Pulmonary Thromboendarterectomy
Ann Thorac Surg 2002;74:180-4
- (58) T.Hirano
Interleukin 6 and its receptor: Ten years later
International Reviews of Immunology
- (59) G.Plenz, Z.F.Song, T.D.T.Tjan, C.Koenig, H.A.Baba, M.Erren, M.Flesch, T.Wichter, H.H.Scheld, M.C.Deng
Activation of the cardiac interleukin-6 system in advanced heart failure
Eur J Heart Fail 3(2001): 415-421
- (60) K.C.Wollert, H.Drexler
The Role of Interleukin-6 in the Failing Heart
Heart Fail Rev 2001;6:95-103

- (61) E.Lindmark, E.Diderholm, L.Wallentin, A.Siegbahn
 Relationship Between Interleukin 6 and Mortality in Patients With Unstable Coronary Artery Disease
 Effects of an Early Invasive or Noninvasive Strategy
JAMA 2001;286: 2107-2113
- (62) D.R.Wagner, T.Kubota, V.J.Sanders, C.F.McTiernan, A.M.Feldman
 Differential regulation of cardiac expression of IL-6 and TNF- α by A₂- and A₃-adenosine receptors
Am J Physiol 1999; 276:H2141-H2147
- (63) C.Scheidt-Nave
 Psychosocial stress, elevation of serum interleukin-6 (IL-6) and C-reactive protein (CRP), and cardiovascular risk among older men and women
- (64) Y.Yazaki, T. Yamazaki
 Reversing Congestive Heart Failure With Endothelin Receptor Antagonists
Circulation 1997;95:1752-1754
- (65) A.Dendorfer
 Was leisten die Vasopeptidase-Inhibitoren?
Cardiovasc 2002;2: 38-42
- (66) A.M. Richards
 Vasopeptidase inhibitors for heart failure: where do we go from here?
Eur J heart fail 2003; 5:411-413
- (67) D.R. McClean, H.Ikram, A.H. Garlick, A.M. Richards, G. Nicholls, I.G. Crozier
 The Clinical, Cardiac and Neurohormonal Effects of Omapatrilat, a Vasopeptidase Inhibitor, in Patients With Chronic Heart Failure
J Am Coll Cardiol 2000; 36: 479-86
- (68) N.C. Trippodo, M. Fox, T.M. Monticello, B.C. Panchal, M.M. Asaad
 Vasopeptidase Inhibition with Omapatrilat Improves Cardiac Geometry and Survival in Cardiomyopathic Hamsters More Than Does Inhibition with Captopril
J Cardiovasc Pharmacol 1999; 34:782-790
- (69) J.L. Rouleau, M.A. Pfeffer, D.J. Steward, D. Isaac, F. Sestier, E.K. Kerut, C.B. Porter, G. Proulx, C. Qian, A.J. Block
 Comparison of vasopeptidase inhibitor, omapatrilat, and lisinopril on exercise tolerance and morbidity in patients with heart failure: IMPRESS randomised trial
Lancet 2000; 356: 615-20
- (70) R.Corti, J.C.Burnett Jr, J.L.Rouleau, F.Ruschitzka, T.F.Lüscher
 Vasopeptidase Inhibitors; A New Therapeutic Concept in Cardiovascular Disease ?
Circulation.2001;104:1856-1862
- (71) F.H. Messerli, J. Nussberger
 Vasopeptidase inhibition and angio-oedema
Lancet 2000; 356: 608-609

- (72) X. Zhang, A. Nasjletti, X. Xu, T.H. Hintze
 Neutral Endopeptidase and Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors Increase Nitric Oxide Production in Isolated Canine Coronary Microvessels by a Kinin-Dependant Mechanism
J Cardiovasc Pharmacol 1998; 31:623-629
- (73) T. Bäcklund, E. Palojoki, A. Saraste, T. Grönholm, A. Eriksson, P. Lakkisto, O. Vuolteenaho, M.S. Nieminen, L.-M. Voipio-Pulkki
 Effect of vasopeptidase inhibitor omapatrilat on cardiomyocyte apoptosis and ventricular remodeling in rat myocardial infarction
Cardiovasc Res 2003; 57:727-737
- (74) W.-C. Liao, O. Vesterqvist, C. Delaney, M. Jemal, I. Ferreira, N. Ford, B. Swanson, H. Uderman
 Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the vasopeptidase inhibitor, omapatrilat in healthy subjects
J Clin Pharmacol 2003; 56:395-406
- (75) C.H. Wang, N. Leung, N. Lapointe, L. Szeto, K.D. Uffelman, A. Giacca, J.L. Rouleau, G.F. Lewis
 Vasopeptidase Inhibitor Omapatrilat Induces Profound Insulin Sensitization and Increases Myokardial Glucose Uptake in Zucker Fatty Rats
Circulation 2003; 107: 1923-1929
- (76) Wayne L. Miller, John C. Burnett Jr., Karen A. Hartman, Michael P. Henle, Mary F. Burrit, Allan S. Jaffe
 Lower rather than higher levels of B-type natriuretic peptides (NT-pro-BNP and BNP) predict short-term mortality in end-stage heart failure patients treated with nesiritide.
AM J Cardiol 2005;96:837-841
- (77) Solomon SD, Skali H, Bourgoun M, Fang J, Ghali JK, Martelet M, Wojciechowski D, Ansmite B, Skards J, Laks T, Henry D, Packer M, Pfeffer MA; OVERTURE Investigators.
 Effect of angiotensin-converting enzyme or vasopeptidase inhibition on ventricular size and function in patients with heart failure: the Omapatrilat Versus Enalapril Randomized Trial of Utility in Reducing Events (OVERTURE) echocardiographic study.
Am Heart J. 2005 Aug;150(2):257-62.
- (78) Matteo Cesari, Brenda Penninx, Anne Newman, Stephen Kritchevsky, Barbara Nicklas, Kim Sutton-Tyrell, Susan Rubin, J.Ding, E.Simonsick, T.Harris, M.Pahor
 Inflammatory Markers an Onset of Cardiovascular Events
 Results From the Health ABC Study
Circulation 2003;108:2317-2322
- (79) R.Vasan, L.Sullivan, R.Roubenoff, C.Dinarello, T.Harris, E.Benjamin, D.Sawyer, D.Levy, P.Wilson, R.D'Agostino
 Inflammatory Markers an Risk of Heart Failure in Elderly Sybjects Without Prior Myokardial Infarcation
 The Framingham Heart Study
Circulation 2003;107:1486-1491

- (80) R.Gaertner, D.Lepailleur-Enouf, W.Gonzales, A.Nicolletti, C.Mandet, M.Philippe, J.-J. Mercadier, J.-B.Michel
 Pulmonary endothelium as a site of synthesis and storage of interleukin-6 in experimental congestive heart failure
*Eur J heart fail*5(2003):435-442
- (81) S.Janssen, G.Gayan-Ramirez, A.Van Den Bergh, P.Herijgers, K.Maes, E.Verbeke, M. Decramer
 Interleukin-6 Causes Myokardial Failure and Skeletal Muscle Atrophy in Rats
*Circulation.*2005;111:996-1005
- (82) D.Murray, G.Freeman
 Proinflammatory Cytokines, Predictors of a failing heart?
*Circulation.*2003;107:1460-1462
- (83) M.Packer, R.Califf, M.Konstam, H.Krum, J McMurray, J.-L.Rouleau, K.Swedberg,
 Comparison of Omapatrilat and Enalapril in Patients With Chronic Heart Failure
 The Omapatrilat Versus Enalapril Randomized Trial of Utility in Reducing Events (OVERTURE)
*Circulation.*2002;106:920-926
- (84) M.Engelmann, L.Niemannb, I.-L.Kanstrupa, K.Skagena, J.Godtfredsen
 Natriuretic peptide response to dynamic exercise in patients with atrial fibrillation
International Journal of Cardiology 105 (2005) 31– 39
- (85) A.Cataliotti,G.Boerrigter,H.Chen, M.Jougasaki, L.Costello,T.Tsuruda,S.-C.Lee,L.Malatino, J.Burnett
 Differential Actions of Vasopeptidase Inhibition Versus Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition on Diuretic Therapy in Experimental Congestive Heart Failure
Circulation. 2002;105:639-644
- (86) K.Nakajimaa, K.Onishib,K.Dohia, M.Tanabea, T.Kuritaa, T.Yamanakaa, M.Itoa, N. Isakaa, T.Noborib, T.Nakanoa
 Effects of human atrial natriuretic peptide on cardiac function and hemodynamics in patients with high plasma BNP levels
International Journal of Cardiology 104 (2005) 332– 337
- (87) Mauro BiffiT, Matteo Bertini, Giuseppe Boriani, Cristian Martignani, Angelo Branzi
 Heart failure after myocardial revascularization: Risk markers
International Journal of Cardiology 105 (2005) 11 –14
- (88) S.Adamopoulos, J.Parissis, D.Farmakis, D.Kremastinos
 Levosimendan therapy in decompensated chronic heart failure:
 Effects on natriuretic peptides and hemodynamic parameters
International Journal of Cardiology 104 (2005) 357 – 358

- (89) Alan Maisel, Judd E. Hollander, David Guss, Peter McCullough, Richard Nowak, Gary Green, Mitchell Saltzberg, Stefanie R. Ellison, Meenakshi Awasthi Bhalla, Vikas Bhalla, Paul Clopton , Robert Jesse and REDHOT Investigators
Primary results of the Rapid Emergency Department Heart Failure Outpatient Trial (REDHOT)

A multicenter study of B-type natriuretic peptide levels, emergency department decision making, and outcomes in patients presenting with shortness of breath

Journal of the American College of Cardiology, Volume 44, Issue 6, 15 September 2004, Pages 1334-1336