

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl

**Einfluss einer kombinierten Hemmung des Renin-Angiotensin-
Aldosteron-Systems auf das kardiale Remodeling nach
experimentellem Myokardinfarkt**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Carsten Gimmler

aus Würzburg

Würzburg, Dezember 2005

Referent: Priv.-Doz. Dr. Johann Bauersachs

Korreferent: Prof. Dr. Bruno Allolio

Dekan: Prof. Dr. Georg Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 20.06.2006

Der Promovend ist Arzt

In memoriam:

Prof. Dr. Hartmut Gimmler
(†2004)

Ab imo pectore!

Inhaltsverzeichnis

I	EINLEITUNG.....	1
II	MATERIAL UND METHODEN.....	11
II.1	STUDIENPROTOKOLL UND KORONARLIGATUR.....	11
II.1.1	<i>Versuchstiere</i>	11
II.1.2	<i>Koronarligatur</i>	11
II.1.3	<i>Einteilung in die Versuchgruppen und Medikation</i>	12
II.2	HÄMODYNAMIK UND LINKSVENTRIKULÄRES VOLUMEN	13
II.3	PROBENENTNAHME UND INFARKTGRÖßENBESTIMMUNG	14
II.4	PROBENAUFBEREITUNG	14
II.4.1	<i>Probenaufbereitung auf Proteinebene</i>	15
II.4.2	<i>Probenaufbereitung für die RNA-Extraktion</i>	15
II.4.3	<i>Synthese der komplementären DNA</i>	16
II.5	LINKSVENTRIKULÄRES HYDROXPROLIN U. KOLLAGEN	16
II.6	WESTERN BLOT.....	17
II.7	QUANTITATIVE REALTIME-PCR.....	18
II.7.1	<i>Quantifizierung kardialer mRNA-Expression mittels Realtime-PCR</i>	18
II.7.2	<i>Herstellung der Plasmid-Standards für die Realtime-PCR</i>	21
II.8	BESTIMMUNG DER PLASMA-ALDOSTERONKONZENTRATION MITTELS RADIO IMMUNE ASSAY	23
II.9	ELEKTROLYTBESTIMMUNG.....	23
II.10	STATISTIK.....	23
III	ERGEBNISSE.....	24
III.1	Globale Parameter	24
III.2	Hämodynamik.....	27
III.2.1	<i>Linksventrikulärer systolischer Druck</i>	27
III.2.2	<i>Linksventrikulärer enddiastolischer Druck</i>	27
III.2.3	<i>Maximale linksventrikuläre Druckerhöhung- bzw. Druckabfallsgeschwindigkeit</i>	28

III.3	LINKSVENTRIKULÄRES KOLLAGEN	30
III.3.1	<i>Linksventrikuläres Kollagen und Kollagen-Volumenfraktion</i>	30
III.3.2	<i>Linksventrikuläre Kollagenexpression</i>	31
III.4	LINKSVENTRIKULÄRE ACE- UND ANF-GENEXPRESSION.....	33
III.4.1	<i>mRNA-Expression des Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE)</i>	33
III.4.2	<i>mRNA-Expression des atrialen natriuretischen Faktors (ANF)</i>	34
III.5	PROTEINEXPRESSION IM LINKEN VENTRIKEL.....	36
III.5.1	<i>Sarcoplasmatische retikuläre Calcium-ATPase (Serca 2 ATPase)</i>	36
III.6	PLASMA-ALDOSTERONSPIEGEL	37
III.7	PLASMAELEKTROLYTE	38
IV	DISKUSSION	40
V	ZUSAMMENFASSUNG.....	50
VI	LITERATUR	51

Danksagung

Lebenslauf

I EINLEITUNG

Im Jahre 1999 konnte in der *RALE-Studie (Randomized Aldactone Evaluation Study)* gezeigt werden, dass bei herzinsuffizienten Patienten durch die additive Gabe des Aldosteron-Antagonisten *Spironolacton* zur Basistherapie mit einem ACE-Hemmer, Digitalis und Diuretikum nicht nur eine Mortalitätsenkung um 30%, sondern auch eine Verbesserung der linksventrikulären Auswurfleistung und der Belastbarkeit erzielt werden konnte (105).

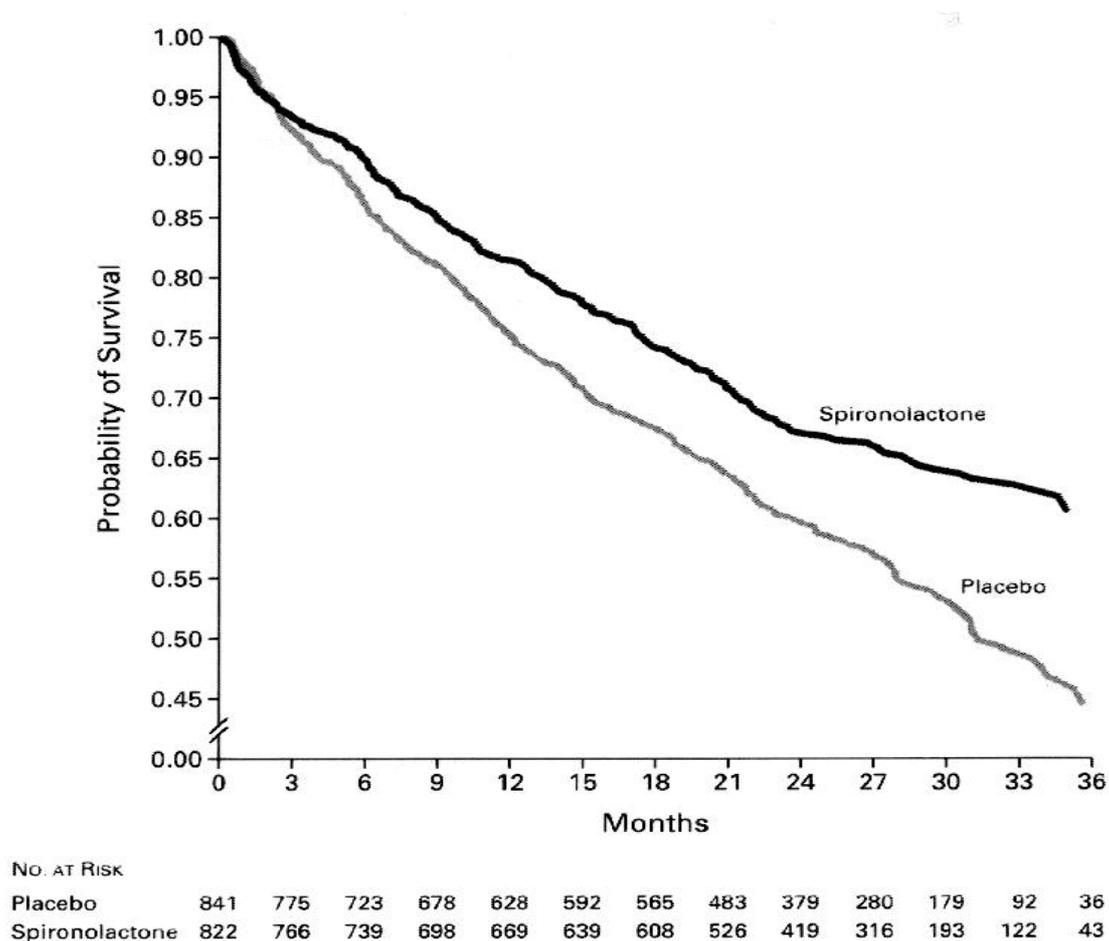


Abbildung 1: Kaplan-Meier Analyse der Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten aus der Placebo (grau) und aus der mit Spironolacton (schwarz) behandelten Gruppe. Das Mortalitätsrisiko unter den mit Spironolacton behandelten Patienten war um 30 % geringer als in der Placebogruppe. ($P < 0.001$). Aus Pitt (105).

Bemerkenswert war, dass die benutzte *Spironolacton*dosis von 25mg/d keine blutdrucksenkende Wirkung hervorrief, was auf einen eigenen, blutdruckunab-

hängigen, kardioprotektiven Effekt hindeutete. Auch in der nachfolgenden *EPHESUS*-Studie (*Eplerenone Post acute myocardial infarction Heart failure Efficacy and SURvival Study*) zeigte sich eine signifikante Senkung der Gesamtmortalität und der Todesrate bzw. Hospitalisierungshäufigkeit kardialer Genese bei den mit dem selektiven Aldosteron-Antagonisten *Eplerenon* behandelten Patienten nach akuten Myokardinfarkt (107, 108).

Wie kommt dieser Effekt zustande? Der Haupteffekt von Aldosteron, dem physiologisch bedeutsamsten Mineralokortikoid, ist der Elektrolyttransport über Epithelien, hauptsächlich in der Niere, aber auch in anderen Geweben wie Speicheldrüsen oder Dickdarm. Aldosteron erhöht durch direkte und indirekte Mechanismen die Rückresorption von Natrium (und damit Wasser) bzw. die Sekretion von Kalium. Somit kann eine Aldosteronüberproduktion zu arteriellem Hypertonus und schließlich auch zu unerwünschten Effekten auf das kardiovaskuläre System führen. Die Aldosteronproduktion im Herzen (92, 122, 145), sowie die Aldosteronspiegel im Plasma (40) sind nach Myokardinfarkt (MI) sowie bei chronischer Herzinsuffizienz erhöht. Man konnte außerdem zeigen, dass ein erhöhter Aldosteronplasmaspiegel ein Indikator für eine schlechte Prognose bei Herzinsuffizienz ist (132). Die in *RALES* oder *EPHESUS* beobachteten Effekte waren allerdings blutdruckunabhängig, d.h. nicht über eine gesteigerte Diurese vermittelt. Folglich liegt ein Einfluß anderer, direkter Aldosteronwirkungen am kardiovaskulären System nahe. Diese sind z.B. eine endotheliale Dysfunktion sowie myokardiale Hypertrophie und Fibrose. Veränderungen in der Zusammensetzung von extrazellulärer Kollagenmatrix und Kardiomyozyten im Herzen begünstigen eine kontraktile Dysfunktion, eine Vergrößerung der Ventrikel und letztlich die Herzinsuffizienz (130, 143). Diese Umbauvorgänge, auch „Remodeling“ genannt finden im Herzen unter den verschiedensten pathologischen Bedingungen wie z.B. Hypertonie, Kardiomyopathie, Klappenfehlern oder nach Myokardinfarkt statt (130) und manifestieren sich in genomischen, molekularen, zellulären und interstitiellen Veränderungen des Herzens, die dann klinisch in Veränderung der Form, Größe und Funktion des Herzens resultieren.

Kardiales Remodeling nach Myokardinfarkt

Die koronare Herzkrankheit inklusive Myokardinfarkt ist heute für ca. Zweidrittel aller Patienten mit systolischer ventrikulärer Dysfunktion verantwortlich (63). Nach Myokardinfarkt findet man sowohl im Infarktgebiet als auch im übrigen Herzen regelmäßig umfangreiche kardiale Umbauvorgänge, die sämtliche Zelltypen des Herzens betreffen, und die Herzfunktion über eine asymptotische kardiale Dysfunktion bis hin zur klinisch manifesten Herzinsuffizienz beeinträchtigen können. So kann man neben der Nekrose im Infarktareal Veränderungen an Kardiomyozten, Fibroblasten, aber auch an glatten Muskelzellen oder Endothelzellen im überlebenden Myokard nachweisen.

Diese Umbauvorgänge werden durch eine Vielzahl verschiedener Faktoren, u. a. direkten Myokardschaden, mechanische oder hämodynamische Belastung, sowie neurohumorale Aktivierung induziert (28). Schon kurz nach Infarkt kann man eine globale, kardiale Dysfunktion anhand hämodynamischer Parameter feststellen, die mit einer Aktivierung neurohumoraler Systeme einhergeht und schließlich in chronischer Herzinsuffizienz mit kontraktiver Dysfunktion des überlebenden Myokards, Hypertrophie und Dilatation enden kann (30, 43, 79). Nach Myokardinfarkt wird so z.B. die Pumpfunktion des Restmyokards durch Hypertrophie der überlebenden Kardiomyozyten aufrecht erhalten: Hypertrophie erhöht die zur Verfügung stehenden kontraktilen Filamente und reduziert die Wandspannung durch Wandverdickung. Dieser zunächst sinnvollen Anpassung folgt ab Überschreitung einer kritischen Grenze jedoch eine erniedrigte Sauerstoffversorgung (Ischämie) der Einzelzelle, eine reduzierte ventrikuläre Compliance und diastolische Relaxationsstörung.

Neben der Hypertrophie der überlebenden Kardiomyozyten findet sich allerdings auch ein über die Infarktzone hinausgehender Zelluntergang, sei es durch Nekrose, Apoptose (83), Anoikis (Zelltod durch Verlust der Zell-Matrix-Beziehung) (34) oder durch kaspaseunabhängige Autophagie (71) der Herzmuskelzellen. Außer dem gesteigerten Zelluntergang findet sich aber auch eine intensive Zellerneuerung: Ein Teil der postnatalen Kardiomyozyten muss deshalb möglicherweise doch teilungsfähig bzw. noch nicht terminal differen-

ziert sein (14, 15). Auch eine Einwanderung extrakardialer Stammzellen in das Myokard steht zur Diskussion (111). Auffällig sind auch Veränderungen, die den kontraktilen Apparat und die Zellform betreffen: So können Metabolismus, Membran- und Kontraktionsproteine sowie elektromechanische Koppelung verändert sein (62). In der Frühphase der Hypertrophie kommt es beispielsweise durch eine Zunahme des Myofibrillenquerschnitts zu einem erhöhten Zellquerschnitt, während es bei fortschreitender Hypertrophie zu einer deletären Längszunahme der Myofibrillen durch Sarkomerreihung ohne weitere Zunahme des Querdurchmessers kommt (48, 98). Eine Dilatation des Ventrikels ist die Folge. Anand et al. (4) konnten allerdings zeigen, dass die Funktion isolierter Kardiomyozyten bei systolischer Dysfunktion nach Herzinfarkt bei Ratten normal war. Dies berechtigt zu der Annahme, dass weitere, vor allem extrazelluläre Faktoren, den größten Einfluss auf die Dyfunktion bei ischämischer Herzinsuffizienz haben. Hier spielt insbesondere die Extrazellulärmatrix eine wichtige Rolle.

Die Extrazellulärmatrix (ECM) ist ein dynamisches Gewebe, das einem kontinuierlichen Turnover unterworfen ist und seine Zusammensetzung und Organisation je nach Umwelteinflüssen und Gewebsverletzungen verändern kann. Im Umkehrschluss können Störungen in der Extrazellulärmatrix aber auch die Organfunktion beeinflussen: So kann die ECM direkt auf die Regulation zellulärer Funktionen Einfluss nehmen, z.B. auf Proliferation und Wachstum, Hypertrophie (115), Zell-Überleben und Apoptose (18, 25), oder die Differenzierung von Kardiomyozyten. Die ECM besteht aus einem komplex organisierten, dreidimensionalen Geflecht aus Elastinen, Proteoglykanen und Kollagen, hauptsächlich vom fibrillären Typ.

Die für die Synthese der kardialen Stützmatrix zuständigen Fibroblasten machen so auch den Großteil aller Zellen im Herzen aus, während die eigentlich kontraktilen Kardiomyozyten nur für ein Drittel der Gesamtzellen verantwortlich sind (154). Dies unterstreicht die enorme Bedeutung der Extrazellulärmatrix, deren Veränderung so auch die zentrale Rolle im Umbau des herzinsuffizienten Herzens und dem Übergang zur kardialen Dekompensation spielt.

Insbesondere Veränderungen, die das Kollagen betreffen, sind hierbei hervorzuheben: Eine vermehrte Kollagenablagerung ist die klassische Reaktion des

Körpers auf eine Gewebsverletzung. Sie ist per se ein sinnvoller, adaptiver Mechanismus, da Kollagen das verletzte oder untergegangene Areal stützt und strukturell verstärkt. Im Rahmen eines Myokardinfarktes findet sich im Bereich des zugrundegegangenen Myokards nach einer anfänglichen Phase des vermehrten Kollagenabbaus ab Tag 7 eine Vermehrung des fibrillären Kollagens (129), die in einer Narbenbildung endet und das Herz auf diese Weise vor einer möglichen Ruptur schützen soll (128).

Allerdings findet man bei Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt auch eine diffuse Fibrose fern der eigentlich Infarkt Narbe (129). Diese globale Kollagenansammlung, die sich insbesondere bei Drucküberlastung des Herzens zu manifestieren scheint, verursacht eine ganze Reihe von Problemen: Zum einen verändern sich die mechanischen Eigenschaften des Herzens mit dem Resultat eines steiferen Ventrikels mit geringerer Compliance (141). Auch wird die Füllung des linken Ventrikels und die diastolische Relaxation behindert. Selbst auf die Reizleitung hat die Fibrosierung eine Auswirkung, insofern als sie ein erhöhtes Potential von Arrhythmien mit sich bringt (126). Die Kollagenvermehrung kann außerdem mit einer Hypertrophie der Kardiomyozyten einhergehen. Es wurde angenommen, dass die Umbauvorgänge im Infarktareal selbst (Infarkt Narbe) nach ca. 6 -8 Wochen abgeschlossen sind, und das Areal dann nur noch aus azellulärem, statischen Kollagen besteht. Tatsächlich ist die Narbe allerdings ein zelluläres, vaskularisiertes, metabolisch aktives Gewebe, das einem dynamischen Turnover unterliegt, somit aber auch beeinflussbar ist (128). Selbiges gilt natürlich umso mehr für das vom eigentlichen Myokardinfarkt verschonte, aber ebenso von den Folgen der Umbauvorgänge betroffene Restmyokard.

Weiterhin verändert sich nicht nur die Kollagenmenge, sondern auch die Verteilung der Kollagenisoformen, die Kollagenarchitektur, sowie die Quervernetzung der Kollagenfasern. Kollagen Typ I macht ca. 85 % des Kollagen im menschlichen Herzen aus. Der andere vorherrschende Isotyp ist Typ III, der elastischere Eigenschaften hat. Eine Veränderung der Typenverhältnisse kann so die myokardiale Compliance, die diastolische Relaxation und somit die kardiale Funktion beeinflussen. Während die räumliche Anordnung der die

Myozyten umspannenden Kollagenfasern im gesunden Herz hochorganisiert ist, ist dieses Netz im kranken Herz unregelmässig und teilweise unterbrochen, die Dicke der perimysialen Fasern geringer (140). Wichtiger für die mechanischen Eigenschaften des Ventrikels scheint aber eine veränderte Quervernetzung der Kollagenfasern zu sein (148): So führt z.B. eine pharmakologische Verhinderung der biochemischen Quervernetzung der Kollagenfasern zu einer vergrößerten myokardialen Compliance und schließlich zur linksventrikulären Dilatation (69).

Die Progression der kardialen Dysfunktion bis zur terminalen Herzinsuffizienz ist anhand klinischer, physiologischer und anatomischer Parameter gut beschreibbar, allerdings sind die zu Grunde liegenden, kausalen Mechanismen auf zellulärer, molekularer und genetischer Ebene bisher nicht ausreichend verstanden. Ein besseres Verständnis dieser Umbauvorgänge, ihrer Auslöser und Signalkaskaden wäre allerdings von Nutzen, um potentielle Angriffspunkte zur Verhinderung der Progression der durch Myokardinfarkt bedingten Herzinsuffizienz zu finden, denn insbesondere nach großen Infarkten kommt es im Verlauf meist nicht mehr zu einer spontanen Verbesserung der funktionalen Kapazität (13).

Adrenerges System und Remodeling

Die Aktivierung des sympathischen Nervensystems bei kardialer Dysfunktion und Herzinsuffizienz ist schon seit langem bekannt. Akut ist die adrenerge Aktivierung möglicherweise sogar von Vorteil, da sie einen Kompensationsmechanismus darstellt, um die kardiale Funktion aufrechtzuerhalten. Eine andauernde Aktivierung aber hat deletäre Konsequenzen, so z.B. einen erhöhten myokardialen Sauerstoffbedarf, eine Flüssigkeits- und Salzretention sowie die Erhöhung von Vor- und Nachlast (120). Katecholamine können auch direkt durch Induktion von Nekrose und Apoptose kardiotoxisch wirken (84). Bei andauernder Katecholaminausschüttung kommt es schließlich zu einer Desensitivierung des adrenergen Systems durch Downregulierung der β -Rezeptoren

und Entkoppelung ihrer Signalwege (23). So sind hohe Noradrenalin Spiegel mit einer schlechteren Prognose der Herzinsuffizienz assoziiert (27). In Studien konnte gezeigt werden, dass eine Blockade der β -Rezeptoren bei Herzinsuffizienz nicht nur eine verbesserte Prognose und eine geringere Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System bewirkt, sondern auch negatives Remodeling am Herzen verhindern kann (53, 54, 81). Die Therapie der Herzinsuffizienz mit Betablockern ist deshalb eine allgemein anerkannte Therapieoption (134). Es ist außerdem bekannt, dass das RAAS das sympathische Nervensystem bei Herzinsuffizienz im Sinne eines positiven Feedbacks aktiviert und so die negativen Konsequenzen einer vermehrten Katecholaminausschüttung verstärkt (157).

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) und Remodeling

Das RAAS kann durch Elektrolytverschiebungen (z.B. Natriumverlust), Wandstress, sowie Druck- und Volumenbelastung des Herz-Kreislaufsystems aktiviert werden (31). Klassischerweise kommt es zu einer vermehrten Freisetzung von Renin aus den juxtaglomerulären Zellen, das wiederum eine vermehrte Umwandlung von Angiotensinogen aus der Leber zu Angiotensin I bedingt. Angiotensin I (AT I) wird vom Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) zu Angiotensin II (AT II) katalysiert. AT II bewirkt schließlich an der Nebennierenrinde eine vermehrte Aldosteronfreisetzung. Sowohl Angiotensin II als auch Aldosteron haben dann vielfältige Wirkungen an ihren Zielorganen.

Zusätzlich zu diesem klassischen Weg wurden auch eine vom RAAS unabhängige, lokale Angiotensinproduktion (143), sowie ACE-unabhängige Produktionswege (z.B. Chymasen) zur AT II-Formation (96, 138) beschrieben. Eine schematische Darstellung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System zeigt Abbildung 2.

RALES zeigte, dass sich ein maximaler Benefit bei den Patienten erzielen ließ, bei denen sich erhöhte Marker für kardiales Remodeling fanden (155). Neurohumorale, genetische und mechanische Parameter beeinflussen diese Umbau-

vorgänge, die wiederum durch eine Hemmung des RAAS positiv zu beeinflussen sind: ACE-Inhibitoren und Angiotensin II Typ 1 (AT₁)-Rezeptorantagonisten schwächen die Wirkungen von Angiotensin II ab, verhindern aber nicht die negativen Effekte von Aldosteron. Selbst bei komplett durch ACE-Inhibitor gehemmten vaskulärem RAAS (11, 65), und sogar bei zusätzlicher AT₁-Rezeptorantagonisten-Gabe (86), finden sich bei Herzinsuffizienz trotzdem noch erhöhte Aldosteron-Spiegel, was den potentiellen Zugewinn einer zusätzlichen Hemmung der Aldosteronwirkung verdeutlicht.

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron System

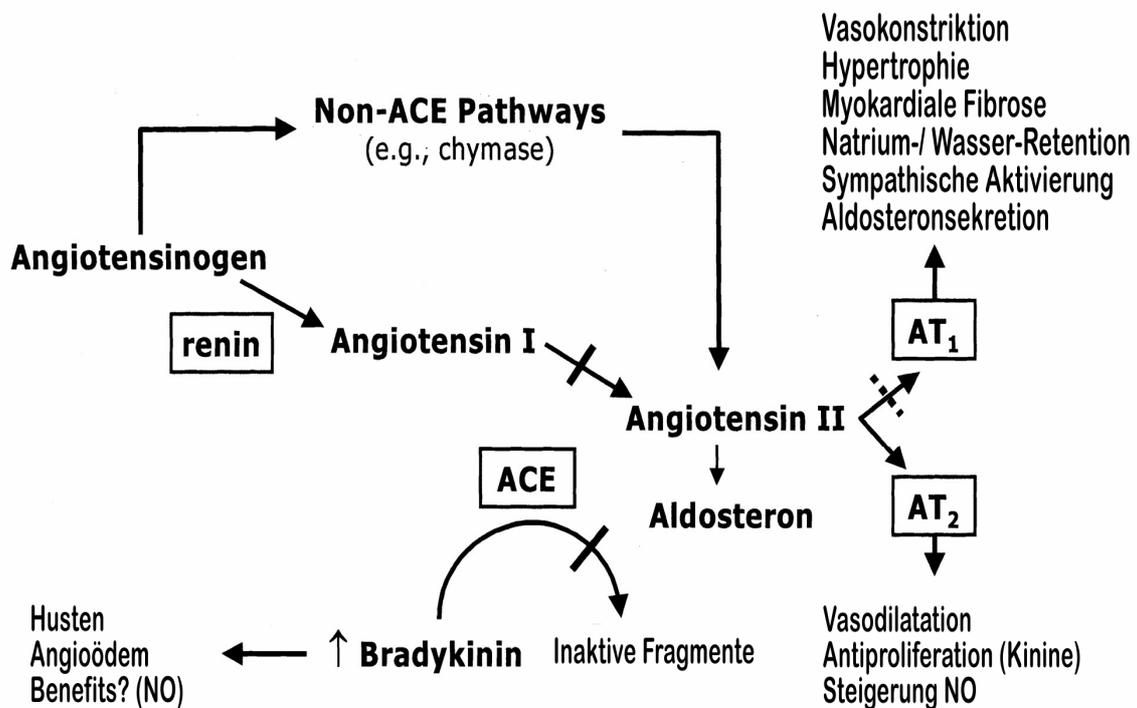


Abbildung 2: Schematische Darstellung des RAAS mit pharmakologischen Interventionsmöglichkeiten und Wirkungen. Man beachte die ACE unabhängige Bildung von Angiotensin II, die möglicherweise positiven Effekte des Bradykinins sowie die differenzierten Wirkungen des Angiotensin II auf seine Rezeptoren. AT₁= Angiotensin II Typ1 -Rezeptor; AT₂= Angiotensin II Typ2 -Rezeptor. Nach McMurray (88).

Aldosteron ist ein Mineralokortikoid, das über den zytosolischen Mineralokortikoidrezeptor klassische genomische Wirkungen wie Stimulierung von Transkription, Translation und Proteinexpression hat. Diese genomischen Wirkungen fordern einen Zeitrahmen von wenigstens 1-2 Stunden, allerdings sind auch schnelle, nicht genomische Wirkungen, z.B. auf das Gefäßsystem (45, 91) beschrieben. Trotz intensiver Forschung konnte jedoch noch kein alternativer Membranrezeptor isoliert werden, so dass man annehmen muss, dass auch diese schnellen, nicht genomischen Effekte zumindest teilweise über den klassischen Mineralokortikoidrezeptor mediiert werden (45, 57). Tatsächlich lassen sich durch den selektiven Mineralokortikoidrezeptor-Antagonisten *Eplerenon*, aber nicht durch das unselektive *Spironolacton*, schnelle, nichtgenomischen Aldosteronwirkungen hemmen (4, 90). Jüngst konnten auch Beweise für eine lokale Aldosteronsynthese im insuffizientem Herzen gefunden werden (121-123, 135): Nach Myokardinfarkt konnte im Herzen sowohl eine erhöhte Expression der Aldosteronsynthase *CYP11B2* als auch eine Hochregulation des Mineralokortikoidrezeptors festgestellt werden (151, 153). Selbst in adrenaletomierten, spontan hypertensiven Ratten konnte man erhöhte Aldosteronspiegel messen, was auf eine von der Nebenniere unabhängige, lokale Mineralokortikoidproduktion hindeutete. Weiterhin verhinderte der Aldosteronantagonist *Spironolacton* selbst bei diesen adrenaletomierten Ratten eine kardiale Hypertrophie (135). Die Expression von Aldosteronsynthase und die kardiale Aldosteronbildung ist zwar in einer Vielzahl von Studien gezeigt worden (68, 121, 122, 135, 151), es soll trotzdem nicht unerwähnt bleiben, dass ihre Existenz dank uneinheitlicher Ergebnisse bei einigen Autoren nicht unumstritten ist, insbesondere was die Menge des synthetisierten Aldosterons und seine Bedeutung anbetrifft (29, 44, 51, 153). Die genauen Mechanismen, die zu den in *EPHESUS* gezeigten positiven Ergebnissen führten, sind allerdings noch weitgehend unbekannt. Aus neueren klinischen Studien geht jedoch hervor, dass sich eine Kombination aus AT₁-Antagonisten und ACE-Hemmern weniger positiv auf das Überleben und Remodeling nach Myokardinfarkt auswirkt als die Kombination mit einem Aldosteron-Antagonisten: Erst kürzlich zeigte die *VALIANT*-Studie (*VALsartan*

In *Acute myocardial iNfarcTion*), dass der AT₁-Antagonist *Valsartan* zwar genauso gut in der Reduktion der Mortalität und anderer kardiovaskulärer Ereignisse bei Hochrisikopatienten nach akutem Myokardinfarkt ist wie der ACE-Hemmer *Captopril*; die Kombination aus beiden aber erhöhte Nebenwirkungen und kein besseres Überleben brachte (102). In der *CHARM-Added (Candesartan in Heart failure Assessment of Reduction in Mortality and Morbidity)* Studie bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz hingegen fand man durch Kombination des AT₁-Antagonisten *Candesartan* mit einem ACE-Hemmer eine signifikante Reduktion der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität (61, 87). Somit stellt sich die Frage, ob sich durch eine Tripletherapie aus ACE-Hemmer, AT₁-Antagonisten und Aldosteron-Antagonisten nochmals eine Verbesserung bei chronisch herzinsuffizienten Patienten erzielen lässt, oder ob man nur die unerwünschten Nebenwirkungen potenziert.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt einer Langzeitbehandlung (9 Wochen) mit dem Aldosteron-Antagonisten *Spironolacton* alleine und in Kombination mit dem ACE-Inhibitor *Trandolapril* bzw. dem AT₁-Antagonisten *Irbesartan* auf Hämodynamik und linksventrikuläres Remodeling (Dilatation, molekulare Veränderungen) bei herzinsuffizienten Ratten im chronischen Infarktmodell untersucht.

II MATERIAL UND METHODEN

II.1 Studienprotokoll und Koronarligatur

II.1.1 Versuchstiere

Die Studie wurde mit erwachsenen, 8-10 Wochen alten, männlichen Wistar-Ratten (*Charles River*, Deutschland) durchgeführt. Die Tiere wurden in einem klimatisierten Tierstall untergebracht und waren einem zwölfstündigen Tag-Nacht-Zyklus unterworfen. Das Gewicht zum Zeitpunkt der Infarzierung betrug zwischen 200 und 250 Gramm (40).

II.1.2 Koronarligatur

Zur experimentellen Induktion eines Myokardinfarktes wurde der Ramus interventricularis anterior der linken Koronararterie (RIVA) operativ verschlossen. Dazu wurden die Ratten mit Äther narkotisiert, intubiert und anschließend mit einer Frequenz von 90/min und einem Atemhubvolumen von 2,5 ml kontrolliert beatmet (*Rodent Ventilator 7025, Ugo Basile*, Italien). Eine Äthertropf-Apparatur war zur Aufrechterhaltung der Narkose zum Respirator in Reihe geschaltet. Nach Rasur und Hautdesinfektion wurde die Cutis mit einer Schere eröffnet, der Musculus pectoralis anschließend stumpf abpräpariert. Nach Vorlage einer Tabaksbeutelnaht wurde mittels einer linkslateralen Thorakotomie durch den Interkostalraum in den Thorax eingegangen, und das Herz nach Eröffnung des Perikards durch Spreizung der Rippen und seitlichen Druck herausluxiert. Der Ramus interventrikularis anterior der linken Koronararterie wurde soweit möglich dargestellt und mit einem 5-0 Prolene Monofilfaden (*Ethicon*, Deutschland) möglichst proximal umstoichen und ligiert. Das Herz wurde anschließend reponiert, der Thorax durch die vorgelegte Tabaksbeutelnaht wieder verschlossen. Die Tiere wurden ab diesem Zeitpunkt mit Raumluft ohne Äther beatmet. Die Haut wurde schließlich mit Metallclips verschlossen und die Tiere bei ausreichender Spontanatmung (ca. 5-10 Minuten postoperativ) extubiert. An-

schließlich wurden die Tiere für die nächsten 5 Stunden überwacht und gegebenenfalls durch Thoraxkompressionen reanimiert. Insgesamt wurden 80 Tiere infarziert. Die Sterblichkeit der infarzierten Tiere vor dem zehnten postoperativen Tag betrug 46 %.

Zur Kontrolle wurden 14 Tiere ohne Anziehen der RIVA-Ligatur bei sonst gleicher operative Vorgehensweise scheinoperiert (Sham). Kein scheinoperiertes Tier starb vor dem zehnten postoperativen Tag. In die spätere Auswertung gingen nur Tiere mit einem ausgedehnten Myokardinfarkt (Infarktgröße $\geq 45\%$) und konsekutiver Herzinsuffizienz nach Ligatur der Koronararterie ein (100).

II.1.3 Einteilung in die Versuchsgruppen und Medikation

Am zehnten postoperativen Tag wurden alle infarzierten Tiere in eines der folgenden fünf Behandlungsregime randomisiert: Placebo (n=19), Monotherapie mit dem Aldosteronantagonisten *Spirolacton* (S; 10mg / kg KG / d; n=10), bzw. Kombinationstherapie aus *Spirolacton* und *Trandolapril* (S+T; 10mg S + 0,3mg T /kg KG / d; n=9), *Spirolacton* und *Irbesartan* (S+I; 10mg S + 50mg I /kg KG / d; n=14) oder der Dreifachtherapie aus *Spirolacton*, *Trandolapril* und *Irbesartan* (S+T+I; 10mg S + 0,3mg T + 50mg I /kg KG / d; n=14). Die Dosierungen der Kombinationstherapien waren analog zur Monotherapie. Alle Medikamente inklusive Placebo wurden einmal täglich per Schlundsonde gegeben, um eine genaue Einhaltung der Dosierung zu gewährleisten. Die verschiedenen Behandlungsschemen sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Während der 9 wöchigen Behandlung war die Sterblichkeit in allen Gruppen vergleichbar gering.

Tabelle 1. Übersicht über die Randomisierung in die verschiedenen Behandlungsarme des Studienprotokolls am 10. postoperativen Tag. Dauer der Behandlung: 9 Wochen.

Sham (n=14)				
alle Placebo				
Infarkte (n=80)				
Placebo	Spironolacton	Kombination von:		
n=19	(S) n=10 10mg/kg KG/d	S+T n=9 10mg S + 0,3mg T /kg KG/d	S+I n=14 10mg S + 50mg I /kg KG/d	S+T+I n=14 10mg S + 0,3mg T + 50mg I /kg KG/d

II.2 Hämodynamik und linksventrikuläres Volumen

Die hämodynamischen Untersuchungen fanden 10 Wochen nach Infarzierung statt. Die Messungen sowie die Probenentnahme für die biochemischen Studien erfolgte nach einem 36 stündigen Intervall seit der letzten Medikamentengabe.

Mittels eines Kochsalz-gefüllten Katheters (PE50) wurden die Herzfrequenz, der mittlere arterielle Druck (MAP), die Druckänderung über die Zeit (dP/dt_{max} bzw. dP/dt_{min}), sowie der linksventrikuläre systolische (LVSP) – bzw. enddiastolische Druck (LVEDP) bestimmt. Der Katheter wurde unter Pentobarbitalnarkose (30 mg / kg KG intraperitoneal) über die rechte A. carotis der Ratten in den linken Ventrikel eingebracht und über einen Dreiwegehahn an ein Micromanometer (Millar Inc., Houston, TX) und einen Statham-Transducer (P23;Becton Dickinson) angeschlossen.

II.3 Probenentnahme und Infarktgrößenbestimmung

Nach Messung der Hämodynamik wurden Blutproben entnommen, die Tiere ausgeblutet, und anschließend die Herzen entnommen. In eiskalter isotoner Kochsalzlösung wurden der rechte vom linken Ventrikel inklusive Septum getrennt und beide Anteile gewogen.

Der linke Ventrikel (LV) wurde anschließend transversal in drei Teile geschnitten: Herzspitze (Apex), Herzmitte (~3 mm) und Herzbasis.

Die Infarktgröße des LV wurde aus queren Mittelringschnitten bestimmt: Von der Herzmitte wurden 5µm Schnitte in 100µm Intervallen gefertigt und mit Picosirius-Rot gefärbt. Die Präparate wurden zur planimetrischen Untersuchung in einem Mikroskop (*Laborlux S, Leitz, Deutschland*) in 16-facher Vergrößerung eingestellt und über eine Videokamera mit Videoschnittstelle (*DLX-930 P, Sony, Japan*) digitalisiert. Mit dem Programm *Sigma Scan Pro (Jandel Scientific, USA)* zum Ausmessen digitalisierter Bilder wurde für jeden Schnitt die relative Infarkt Narbenlänge sowie der linksventrikuläre Umfang der Ventrikel innen- und außenwand bestimmt. Die so gewonnenen Werte dienten zur Ermittlung der prozentualen Infarktgröße errechnet aus dem Quotienten der Summe von epi- und endokardialen Narbenumfang und der Summe der Gesamt-(endo- und epikardialen) Umfänge. Die mittlere Infarktgröße wurde als Mittel aller Schnitte angegeben.

Tiere mit einer myokardiale Narbe $\leq 45\%$ wurden ausgeschlossen, so dass nur ausgedehnte Infarkte in die Auswertung eingingen.

II.4 Probenaufbereitung

Da der Einfluss des linksventrikulären Remodeling im überlebenden linken Ventrikel untersucht werden sollte, wurde die Narbe sorgfältig vom überlebenden Myokard des linken Ventrikels (insbesondere Septum) abgetrennt, und nur letzteres weiter untersucht. Das überlebende Myokard des linken Ventrikels ohne Narbe wurde dafür in einem sterilen Mörser unter flüssigem Stickstoff

homogenisiert und portioniert: Ein Teil wurde für eine spätere RNA-Bestimmung bei -80°C eingefroren, ein Teil für Proteinuntersuchung gleich weiterverarbeitet. Die Blutproben wurden abzentrifugiert, das Plasma aliquotiert und bei -80°C zur weiteren Verwendung eingefroren.

II.4.1 Probenaufbereitung auf Proteinebene

II.4.1.1 Homogenisierung u. Extraktion

Die Proben des überlebenden linken Ventrikels wurden unter flüssigen Stickstoff zu einem feinen Pulver zermörsert und in eiskaltem *RIPA-Buffer* (150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-Cl, 5 mmol/L EDTA, 1%v/v Nonidet P-40, 0,5%w/v Deoxycholat, 10 mmol/L NaF, 10 mmol/L Natriumpyrophosphat, 100 mmol/L Phenylmethylsulfonylfluorid, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Aprotinin und 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Leupeptin) lysiert. Anschließend wurden die Proben 20 min bei 4°C und 8000 g (RCF) zentrifugiert. Der Überstand mit den gelösten Proteinen wurde aliquotiert und zur späteren Verarbeitung bei -80°C eingefroren. Die entstandenen Pellets wurden 30 min in 0,06N HCL angedaut und nochmals bei 8000 g zentrifugiert. Anschließend wurden die Pellets für mehrere Tage getrocknet und für die Hydroxprolinbestimmung verwendet.

II.4.2 Probenaufbereitung für die RNA-Extraktion

Die Gewebeproben wurden in sterilen Mörsern unter flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zermahlen. Ca. 30 - 80mg Pulver wurde dann in 1 ml TRIzol-Reagenz (*Invitrogen Life Technologies*) homogenisiert, und die RNA nach leicht modifizierten Herstellerangaben in einer Einschritt-Methode extrahiert und aufgereinigt. Schließlich wurde die extrahierte RNA in RNase freien DEPC-Wasser (*ResGen Invitrogen Cooperation*) gelöst und in einer Dreifachbestimmung photospektrometrisch (*Ultrospec 3100 Pro, Amersham*) RNA-Gehalt und Reinheit der Extraktion bestimmt. Die $\text{OD}_{260/280}$ Ratio aller Proben war größer 1,8. Alle Proben wurden bei -80°C gelagert.

II.4.3 Synthese der komplementären DNA (cDNA)

Die RNA-Proben wurden mittels *Superscript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen Life Technologies)* nach Herstellerangaben in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Es wurden jeweils 1µg RNA eingesetzt. Mittels *Superscript™ II RNase H⁻ Reverser Transkriptase* und Oligo(dT)₁₂₋₁₈-Primern wurde die cDNA synthetisiert. Aus der cDNA wurde mittels *E. coli RNase H (Invitrogen Life Technologies)* RNA-Reste entfernt, und das Endprodukt 1:5 mit Tris EDTA Puffer pH 8,0 (*Fluka, Buchs*) verdünnt und aliquotiert.

II.5 Linksventrikuläres Hydroxyprolin u. Kollagen

Die getrockneten Pellets aus der Proteinextraktion wurden gewogen und anschließend 24h bei 110°C in 1 ml / mg Trockengewicht 6 N Salzsäure verdaut. Anschließend wurden alle Proben auf 1 ml HCL 6 N gebracht. 50 µl Probe wurde mit der gleichen Menge NaOH 6 N neutralisiert, und mit Chloraminlösung (7% Chloramin-T in Zitrat-Acetat-Puffer) oxidiert. Es wurde Ehrlich'sche Lösung (Dimethylamino-benzaldehyd) in 60%iger Perchlorsäure hinzugegeben, die einen Komplex mit Hydroxyprolin bildet. Dieser Komplex wurde dann spektrophotometrisch (*Ultrospec 3100 Pro, Amersham*) bei 558nm gemessen (38, 125). Unter der Annahme, dass Kollagen im Schnitt 13,4% Hydroxyprolin enthält, wurde der Kollagengehalt in µg / mg Trockengewicht Gewebe angegeben (80).

Außerdem wurde die Kollagen-Volumen-Fraktion in Prozent mittels Hellfeldmikroskopie wie vorbeschrieben (103, 146) mit geringen Modifikationen quantifiziert (siehe Abbildung 3). Dazu wurden Formalin-fixierte, mit Picosirus-Rot gefärbte und in Paraffin eingebettete 7µm Schnitte aus dem interventrikulären Septum unter einem Video Analyse System (Mikroskop: *Laborlux S*, mit 10 x Objektiv, *Leitz*; CCD Video Kamera: *DLX-930 P, Sony*; Software: *Sigma Scan Pro 2.0, Jandel Scientific*) zunächst durch einen rot absorbierenden Blaufilter (*Schott BG23 3.0, Itos*) aufgenommen. Der identische Bildausschnitt wurde dann nochmals im polarisierten Licht in Graustufen eingelesen und die Helligkeitswerte der einzelnen Pixel digital subtrahiert. Alle Pixel mit einem Hellig-

keitswert größer 0 repräsentieren so Kollagen (103, 146). Nach einer Binärumwandlung (Grauwert 0 = schwarz und Grauwert ≠ 0 = weiß) konnte der Kollagengehalt mittels *Scion Image for Windows* Version Beta 4.0.2 (*Scion Cooperation*) quantifiziert werden, wobei Kollagen als der Anteil der weißen Pixel erfasst wurde. Der Kollagengehalt in Prozent wurde aus jeweils drei zufällig ausgewählten Bereichen des Septum berechnet und gemittelt.

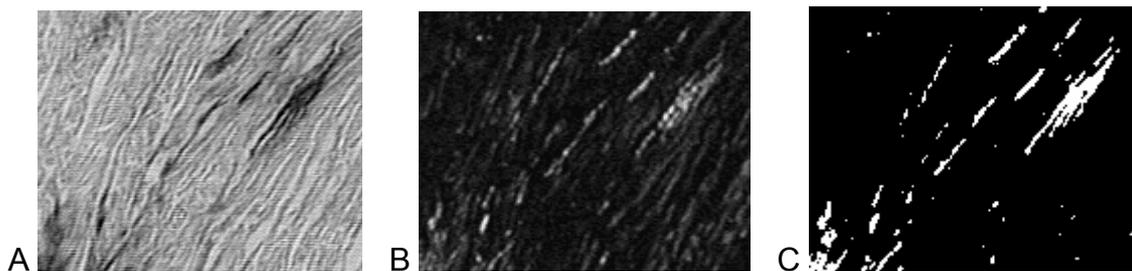


Abbildung 1: Mikroskopische Bestimmung der Kollagen volumenfraction: (A): Im blaugefilterten Bild erscheinen die Kollagenfasern dunkel und die Myozyten hell. (B): Polarisiertes Bild des identischen Ausschnittes. Nach Subtraktion der beiden Ausschnitte und binärer Umwandlung der Graustufen ergibt sich Bild (C), in dem die weißen Bildpunkte das Kollagen widerspiegeln.

II.6 Western Blot

Der Proteingehalt der Proben wurde mittels Bradford Protein Assay (*Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad*) bei 595 nm gegen einen Standard aus lyophilisierten Rinder IgG (*Protein Standard I, Bio-Rad*) photometrisch (*Ultrospec 3100 Pro, Amersham*) bestimmt. Alle Proben eines Blots wurden mit RIPA-Puffer auf den selben Proteingehalt normalisiert. Bei jedem Blot wurde außerdem eine Probe aus einem vorausgegangen Blot als Standard mit aufgetragen, um eine Vergleichbarkeit der Blots untereinander zu gewährleisten. 40 µl Probe wurden mit 20 µl *Blue Loading Buffer (BioLabs)* versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Je 15 µl Probe wurden auf einem 12%igen SDS-Gel aufgetragen und unter reduzierenden Bedingungen getrennt. Als Referenz dienten *Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad)*. Die Proteine wurden auf eine PVDF Membran (*Immun-Blot® 0.2 µm, Bio-Rad*) elektrotransferiert und über Nacht bei 4°C in Tris buffered saline-Tween (TBS-T) mit 5% *ECL Blocking Agent (Amersham)* blockiert. Mit dem jeweiligen Primärantikörper wurde bei Raumtemperatur für 2h

in TBS-T mit 0,5%igen *Blocking Agent* inkubiert. Die verwendeten Primärantikörper mit Verdünnung sind Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 2. Primärantikörper

Antigen:	Antikörper:	Hersteller:	Verdünnung:	Isotyp:
Sarcoplasmatische oder retikuläre Calcium ATPase	Serca2 ATPase, MA3-919	Affinity BioReagents	1:2000	Maus IgG2a

Nach mehrmaligen Waschen in TBS-T wurde dann 1h bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper in der Verdünnung 1:10000 inkubiert. Der Sekundärantikörper [*Anti-mouse IgG (Amersham)*] war mit Meerrettichperoxidase konjugiert und ermöglichte so die Detektion der Banden mittels Chemilumineszenz Assay (*ECL Plus, Amersham*). Die Blots wurden auf Autoradiographiefilmen (*Hyperfilm™ECL, Amersham*) dokumentiert und densitometrisch mittels *Scion Image for Windows* Version Beta 4.0.2 (*Scion Cooperation*) ausgewertet. *Scion Image* basiert auf der Software *National Institutes of Health Image*.

II.7 Quantitative Realtime-PCR

II.7.1 Quantifizierung kardialer mRNA-Expression mittels Realtime-PCR

Die Genexpression von Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), des Atrialen Natriuretischen Faktors (ANF), Kollagen Typ I $\alpha(2)$ (Coll I) und des Angiotensin-Converting-Enzymes (ACE) wurden gegen einen internen Standard quantifiziert.

Je 2 μ l der cDNA-Probe (bzw. des Plasmid-DNA-Standards) wurden in einem *iCycler iQ™* System (*Bio-Rad*) mittels *TaqMan*-Sonde quantifiziert. Insgesamt wurden je Probe noch 12,5 μ l *iQ Supermix (Bio-Rad)*, 2 μ l MgCl₂ (5 mM), 5,5 μ l PCR-reinem H₂O und je 1 μ l des genspezifischen Primers (400 nM) bzw. der genspezifischen Sonde hinzugegeben (Tabelle 3).

Tabelle 3: Nukleotidsequenzen der genspezifischen Primer bzw. Sonden. (Abkürzungen: GAPDH = Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase; ANF = Atrialer Natriuretischer Faktor; ACE = Angiotensin-Converting-Enzymes; BP = Basenpaare; se = sense; as = antisense).

mRNA		Oligo-Nukleotid-Sequenz	BP	Lit.	GenBank Acc. Nr.
GAPDH	Primer: se. as. Probe	TATCGGACGCCTGGTTACCA TTGACTGTGCCGTTGAACTTG CCATCAACGACCCCTTCATTGA CCTC	144	(95)	X02231
ANF	Primer: se. as. Probe	AAATCCCGTATACAGTGCGG GGAGGCATGACCTCATCTTC TCAAGAACCTGCTAGACCACCT GGAGGAGA	105	(149)	M25297
Kollagen Typ I $\alpha(2)$	Primer: se. as. Probe	TGCTGCTTGCAGTAACGTCG TCAACACCATCTCTGCCTCG ACTGGAGACAGAGGACCGCGT GGAC	136	(95)	NM053356 AF121217
ACE	Primer: se. as. Probe	CAAGACATTTGACGTGAGCAAC GTCAGATCAGGCTCCAGTGACA CAGTGCTGCCTCCCAACGAGTT AGAAGA	201	(149)	U03734

Die spezifischen Sonden (*TIB MolBioI*) waren mit dem fluoreszierenden Farbstoff *FAM* (6-Carboxyfluorescein) am 5'-Ende, und mit dem Quencher *TAMRA* (6-Carboxytetramethylrhodamin) am 3'-Ende markiert. Solange die Sonde intakt ist, wird die kurzwellige Fluoreszenz des Reporters durch den Quencher in langwellige umgewandelt (*FRET: Fluorescence resonance energy transfer*). Sobald die Sonde aber gebunden hat wird sie durch die 5'-Exonuklease Aktivität der *Taq*-Polymerase hydrolysiert, und der Reporter vom Quencher getrennt (siehe Abbildung 4). Es resultiert eine relativ höhere kurzwellige Fluoreszenz,

die direkt proportional zur Anzahl der DNA-Moleküle zu Beginn des aktuellen Zyklus ist (49, 50, 59).

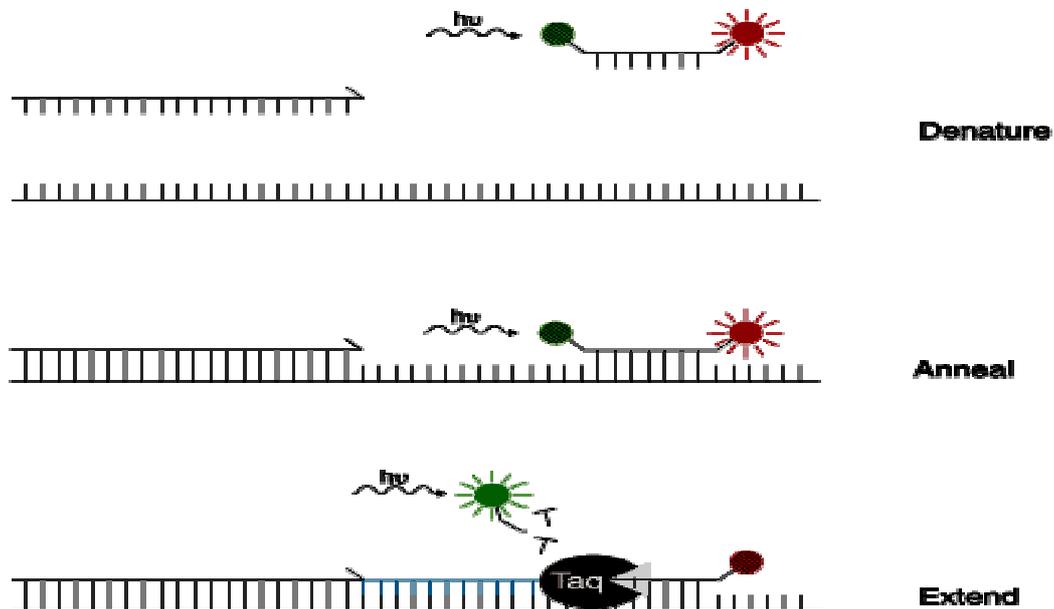


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Realtime PCR mittels TaqMan-Sonde: In der intakten Sonde wird Energie (via FRET) von der kurzwelligen Fluorophore auf die langwellige Fluorophore (Quencher) am anderen Ende übertragen, die kurzwellige Fluoreszenz wird unterdrückt. Nach Hybridisierung der Sonde wird der Energietransfer mittels FRET durch die Endonukleaseaktivität der Taq-Polymerase durchbrochen, und die Sonde fluoresziert bei Anregung. Quelle: Invitrogen.

Der Zyklus, in dem die Fluoreszenz das erste Mal statistisch signifikant über der Hintergrundfluoreszenz liegt, wird als „threshold cycle“ (C_t) (Abbildung 5) bezeichnet. Aufgrund des linearen Zusammenhangs zwischen dem Logarithmus der Konzentration und dem C_t kann mit Hilfe der Standard-Verdünnungsreihe auf die ursprüngliche Anzahl der Genkopien zurückgerechnet werden. Alle Ergebnisse wurden mangels besserer Alternativen auf das endogene „House-keeping Gen“ GAPDH normalisiert (70, 131, 139). Folgendes thermales Profil wurde verwendet: 2 min bei 95°C (1 Startzyklus), 15 s bei 95°C und 1 min bei 60°C (40 Zyklen).

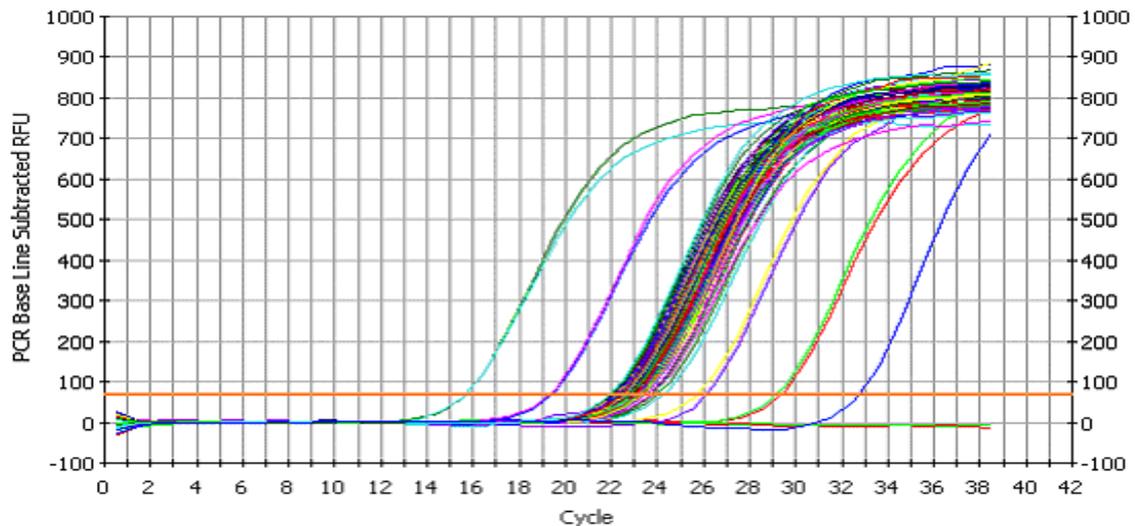


Abbildung 3. Beispielhafter Report einer quantitativen Realtime PCR. Es ist die Fluoreszenz gegen die Anzahl Zyklen aufgetragen. Je nach Ausgangsgehalt an cDNA-Kopien steigt die Fluoreszenz der Proben und Standards nach einer bestimmten Anzahl Zyklen über die Hintergrundfluoreszenz an. Der Schnittpunkt der Kurven mit der waagrechten Linie gibt Zyklus an, an dem die Proben erstmals signifikant über der Hintergrundfluoreszenz liegen (Threshold Cycle, C_t).

II.7.2 Herstellung der Plasmid-Standards für die Realtime-PCR

Die Plasmide wurden mittels *TOPO TA Cloning®-Kit (Invitrogen)* hergestellt. In einem ersten Schritt wurde cDNA mittels spezifischer Primer (siehe Tabelle 3) amplifiziert. Dazu wurde je 2µl cDNA mit einem Mastermix aus je 1µl Forward- und Reverse-primer (20 pmol), 5µl 10x PCR-Puffer (*Pharmacia*), 1µl dNTP-Mix (*Roche*), 0,5µl *Taq*-DNA-Polymerase (*Pharmacia*) und 39,5µl destilliertem Wasser angesetzt. Folgendes Thermoprofil wurde in einem *Mastercycler gradient (Eppendorf)* benutzt: 3 min bei 95°C (ein Startzyklus), 30 sec bei 95°C, 30 sec bei 60°C, 30 sec bei 72°C (35 Zyklen) und abschließend einmalig 10 min bei 72°C. Die PCR-Produkte wurden anschließend in einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt und unter UV-Licht isoliert. Die DNA wurde mittels *QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)* aus dem Gel extrahiert und aufgereinigt.

Anschließend wurde die DNA in die Plasmidvektoren (*pCR®2.1-TOPO 3.9kb*) eingefügt. Dafür wurden 3µl gereinigte DNA mit 3µl *TOPO*-Cloning-reaction-mix (bestehend aus je 1µl Salzlösung, sterilem H₂O und *TOPO*-Vector) für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, und dann 2µl der Lösung in ein Gefäß mit *One Shot® Competent E. coli* gegeben.

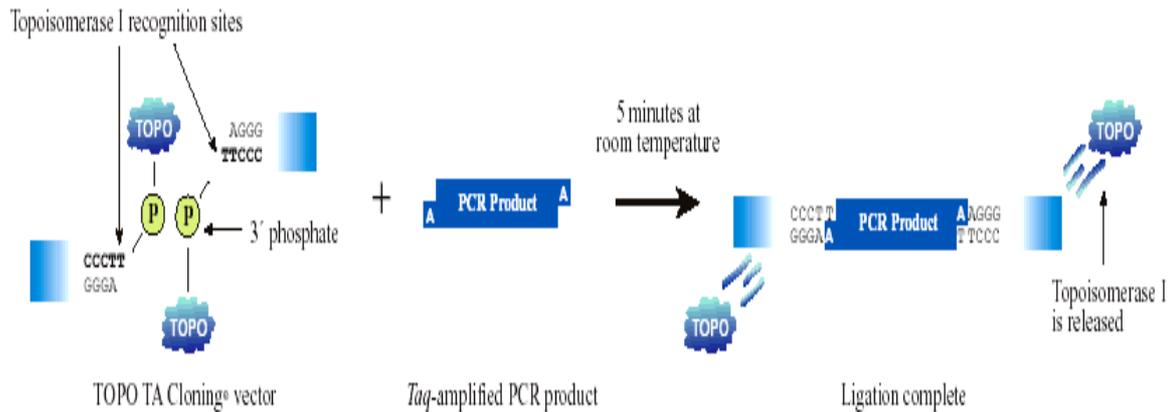


Abbildung 4: Insertion des Zielgens in den TOPO-Vector mittels Topoisomerase I. Quelle: Invitrogen.

Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis und 30 sec bei 42°C wurden 250µl raumwarmes SOC-Medium dazugeben, und die Suspension für 1 h bei 37°C unter Durchmischung inkubiert. Danach wurden 50-75µl der Suspension auf vorgewärmte, mit je 40µl IPTG (100 mM) und X-Gal (40 mg/ml) präparierte Agarplatten geimpft. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag die Kolonien nach blauer bzw. weißer Farbe selektiert. Nur die weißen Kolonien wurden auf neue Platten angeimpft. Die Transformation der positiven Klone wurde durch PCR (mittels Forward und Reverser M13-Primer) und nachfolgende Gelelektrophorese überprüft. Nur Klone die ein Genprodukt der erwarteten Länge herstellten, wurden über Nacht in 4ml LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin bei 37°C weiterinkubiert.

Mittels *QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)* wurden die dann positiven Plasmide extrahiert und aufgereinigt, die Insertion der zu amplifizierenden DNA mittels Sequenzierung überprüft (*T7 Promoter*).

Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde anschließend photospektrometrisch bei OD₂₆₀ bestimmt, und Standard-Verdünnungsreihen (10⁸ – 10³ Kopien/µl) mittels TE-Puffer hergestellt. Die entsprechende Anzahl Plasmidkopien wurde unter der Annahme, dass 1µg der 1000 bp DNA 9,1 x 10¹¹ Molekülen entsprechen, errechnet.

II.8 Bestimmung der Plasma-Aldosteronkonzentration mittels Radio Immune Assay (RIA)

Zur Quantifizierung der Aldosteronkonzentration im Plasma wurde ein *ALDOCTK-2* Radio-Immune-Assay (*DiaSorin*, Dietzenbach) verwendet. Nach Anweisungen des Herstellers wurden die Reagenzien in die mit Hasenantikörpern beschichteten Messröhrchen pipettiert und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden jeweils 200µl Probe eingesetzt. Nach der Inkubation wurde der Überstand aspiriert, und die Radioaktivität des mit I^{125} markierten Aldosterontracers mittels Multi-Kristall Gamma-Zähler (*LB 2111*, *Berthold*) gemessen. Das Plasma-Aldosteron in pg / ml wurde als Mittelwert einer Doppelbestimmung angegeben.

II.9 Elektrolytbestimmung

Die Elektrolyte (Natrium, Kalium, Chlorid) der Plasmaproben wurden freundlicherweise durch das Zentrallabor der Universität Würzburg mittels Potentiometrie an einer ionenselektiver Elektrode (*Cobas Integra 800*, *Roche*) aus verdünntem Plasma (indirekte ISE) routinemäßig bestimmt.

II.10 Statistik

Die statistischen Analysen wurden mittels *One-Way-ANOVA* durchgeführt, gefolgt von multiplen Vergleichen mittels *Fisher's protected least-significant difference test*. Es wurde *StatView 5.0* (*Abacus Concepts*) als Analyseprogramm benutzt. Alle Daten wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts angegeben (mean \pm SEM).

III ERGEBNISSE

III.1 Globale Parameter

Die experimentell erzielte Infarktgröße mit durchschnittlich 53% sowie das Körpergewicht waren in allen Versuchsgruppen vergleichbar (Tabelle 4). Die herzinsuffizienten Tiere wiesen in den Transversalschnitten des linken Ventrikels eine Vergrößerung der Kammervolumen-Querschnittsfläche auf (Tabelle 4 und Abbildung 7), welche am besten signifikant durch die Dreifachhemmung des RAAS normalisiert werden konnte.

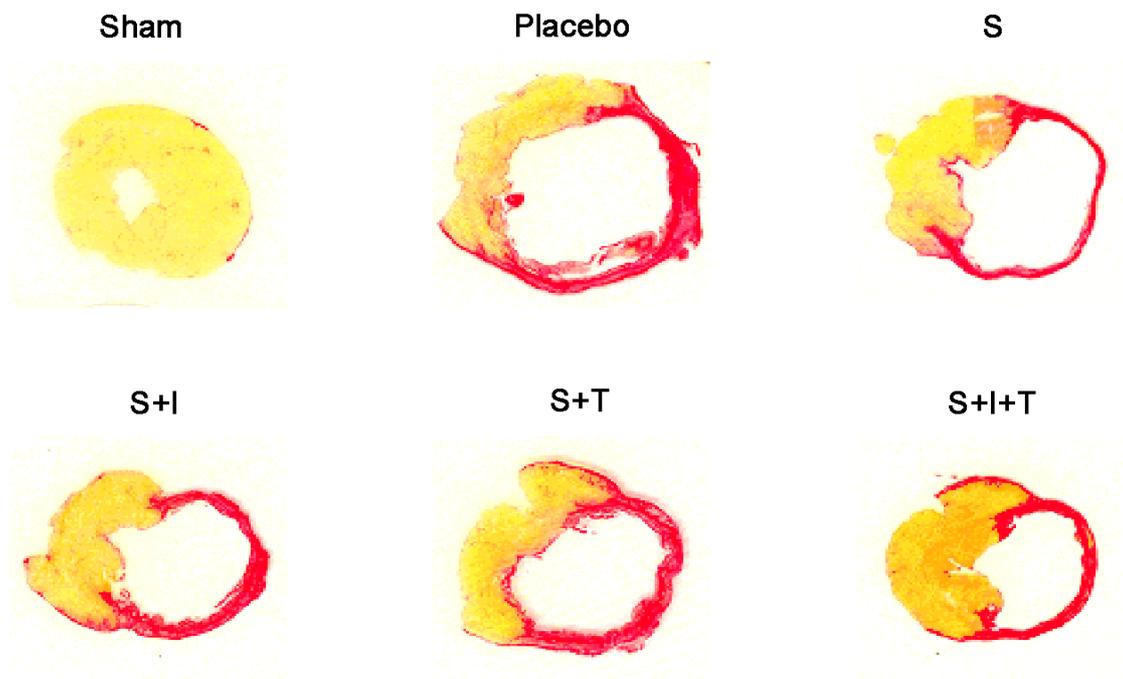


Abbildung 1: Transversalschnitte des linken Ventrikels (Picosirius-Rot-Färbung). Die Schnitte stammen aus der Mitte des linken Ventrikels. Das Narbengewebe der Myokardinfarkte stellt sich rot eingefärbt dar. In den beispielhaften Schnitten sieht man anteriore Myokardinfarkte, die sich bis in die anterolaterale Wand ausdehnen. Folge ist eine Vergrößerung des linksventrikulären Ventrikeldurchmessers und der linksventrikulären Ventrikelquerschnittsfläche. Diese Veränderungen wurden am effizientesten durch die Dreifachblockade des Renin–Angiotensin–Aldosteronsystemes mittels ACE- Hemmer, AT₁-Rezeptorantagonist und Aldosteronantagonisten normalisiert. (S=Spironolacton; I=Irbesartan; T=Trandolapril).

Das Gewicht des rechten Ventrikels (RV) der Placebo-Tiere war deutlich höher als das der scheinoperierten Tiere (Sham). Das RV-Gewicht wurde durch *Spironolacton*-Monotherapie, sowie durch die Dualtherapie aus *Spironolacton* und *Trandolapril* bzw. *Irbesartan* signifikant reduziert. Die Dreifachtherapie führte im Vergleich zu den Zweifachtherapien zu einer weiteren signifikanten Abnahme des rechtsventrikulären Gewichtes (Tabelle. 4 und Abbildung 8).

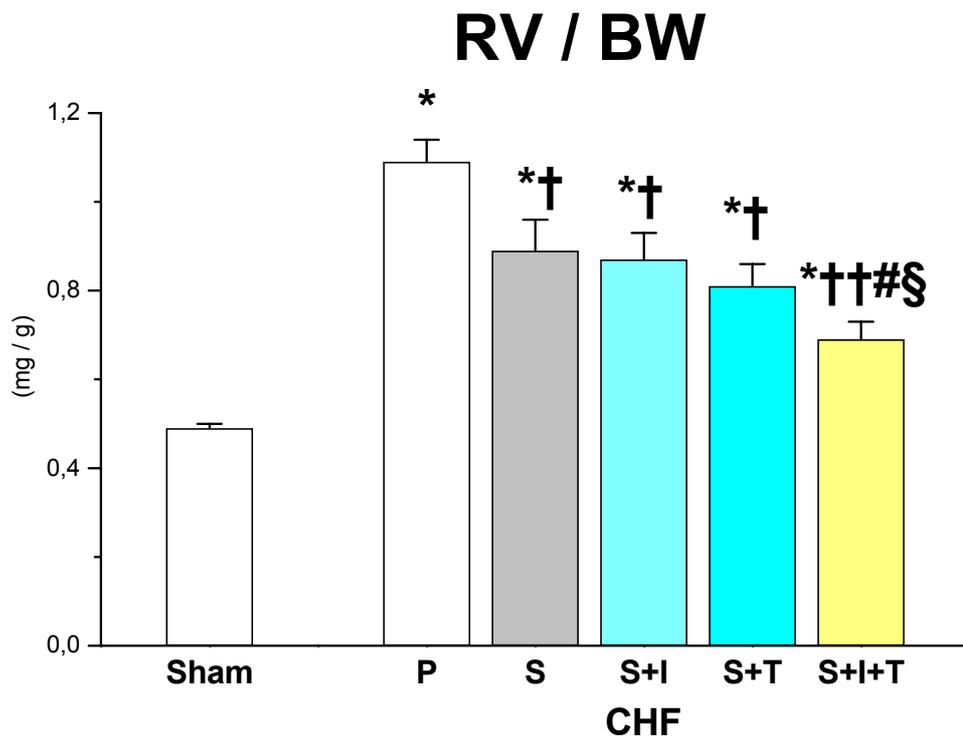


Abbildung 8: Verhältnis des Gewichts des rechten Ventrikels (RV) zum Gesamtkörpergewicht (Bodyweight, BW). Das RV-Gewicht der nur scheinoperierten Tiere (Sham) ist gegenüber den infarzierten, herzinsuffizienten Tieren signifikant niedriger. Eine Hemmung des RAAS reduziert das Gewicht des rechten Ventrikels, wobei die Dreifachkombination aus *Spironolacton* (S), *Irbesartan* (S) und *Trandolapril* (T) signifikant besser als die *Spironolacton*-Monotherapie ($p < 0,05$) und Kombination aus *Spironolacton* und *Irbesartan* ($p < 0,05$) abschneidet und den Quotienten aus RV-Gewicht zu Körpergewicht am effektivsten reduziert. Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Sham; † $p < 0,01$, †† $p < 0,001$ vs. Placebo; § $p < 0,05$ vs. S+I; # $p < 0,05$ vs. S.

Tabelle 4: Globale Parameter der scheinoperierten (Sham) und der mit Spironolacton (S), Irbesartan (I), Trandolapril (T) oder einer Kombination behandelten herzinsuffizienten Ratten 10 Wochen nach experimentellem Myokardinfarkt. Die Infarktgröße ist in allen Gruppen vergleichbar. Das Verhältnis des Gewichts des rechten Ventrikels (RV) zum Gesamtkörpergewicht (Bodyweight, BW) ist bei den herzinsuffizienten Tieren gegenüber den scheinoperierten Tieren deutlich erhöht und wird durch Therapie wieder erniedrigt (siehe Abb. X). Selbiges gilt auch für die Kammerolumen-Querschnittsfläche des linken Ventrikels (LV Cavity Area). Angegeben als Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Sham; † $p < 0,05$, ‡ $p < 0,01$, †† $p < 0,001$ vs. Placebo; § $p < 0,05$ vs. S+I; # $p < 0,05$ vs. S.

	Sham	Herzinsuffiziente Tiere nach Myokardinfarkt behandelt mit				
		Placebo	S	S+I	S+T	S+I+T
Infarktgröße (%)	-	52,3 \pm 1,6	53,2 \pm 2,5	55,0 \pm 1,9	53,8 \pm 1,7	50,6 \pm 2,1
RV/BW (mg/g)	0,49 \pm 0,01	1,09 \pm 0,05*	0,89 \pm 0,07*†	0,87 \pm 0,06*†	0,81 \pm 0,05*†	0,69 \pm 0,04* †† # §
LV Cavity Area (mm ²)	-	52,1 \pm 3,8	43,3 \pm 7,3	38,5 \pm 3,2‡	38,6 \pm 5,1‡	37,1 \pm 3,8†

III.2 Hämodynamik

III.2.1 Linksventrikulärer systolischer Druck (LVSP)

Bei allen herzinsuffizienten Tieren fand sich unabhängig von der Behandlung ein erniedrigter linksventrikulärer-systolischer Druck (LVSP, Abbildung 9). Alle Hämodynamikdaten sind nochmals in Tabelle 5 zusammengefasst.

III.2.2 Linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP)

Der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) hingegen war bei allen infarzierten Tieren erhöht, die Behandlung mit *Spironolacton* alleine, bzw. in Zweifachtherapie in Kombination mit ACE-Inhibitor oder AT₁-Antagonisten brachte eine gegenüber der Placebobehandlung signifikante Reduzierung ($p < 0,05$ vs. Placebo) des LVEDP, wobei die Dreifachtherapie aus Aldosteronantagonist, ACE-Hemmer und AT₁-Rezeptor-Antagonisten den LVEDP nochmals stärker senkte ($p < 0,01$ vs. Placebo, Abbildung 9).

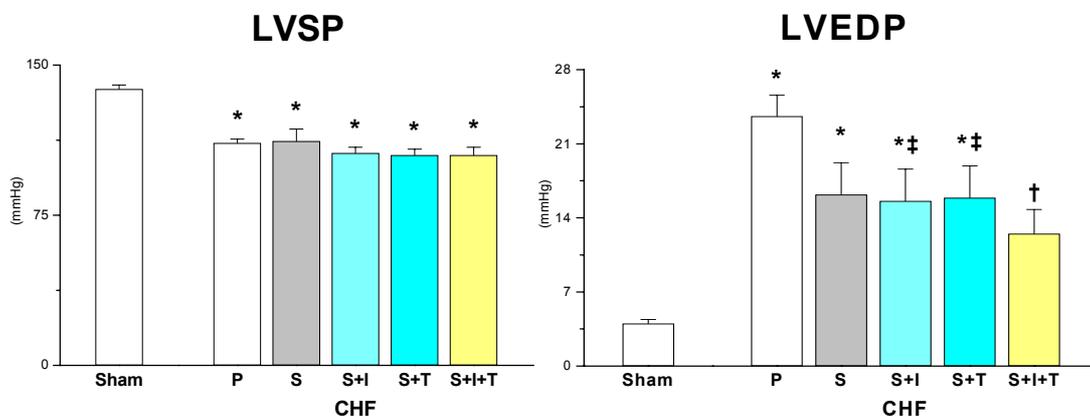


Abbildung 9: Linksventrikulärer, systolischer Druck (LVSP) und linksventrikulärer, enddiastolischer Druck (LVEDP) 10 Wochen nach experimentellen Herzinfarkt. Gegenüber den scheinoperierten (Sham) Tieren ist der LVSP signifikant erniedrigt, während der LVEDP signifikant erhöht ist. Die Dreifachkombination aus Aldosteronantagonist, ACE-Hemmer und AT₁-Rezeptorblocker hat den größten Effekt auf den LVEDP. (P=Placebo; S=Spironolacton; I=Irbesartan; T=Trandolapril). Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Sham; ‡ $p < 0,05$, † $p < 0,01$ vs. Placebo.

III.2.3 Maximale linksventrikuläre Druckanstiegs- bzw. Druckabfallsgeschwindigkeit

Die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt_{max}) bzw. die maximale Druckabfallsgeschwindigkeit (dP/dt_{min}) des linken Ventrikels (Abbildung 10) als Maß der Kontraktilität war bei allen Gruppen gegenüber den scheinoperierten Tieren vermindert. *Spiro nolacton*-Monotherapie verbesserte diese Parameter tendenziell, eine signifikante Verbesserung wurde mittels Zweifachtherapie ($p < 0,05$ vs. Placebo) erzielt, wobei die Tripeltherapie wiederum nochmals die Ergebnisse verbesserte ($p < 0,01$ vs. Placebo).

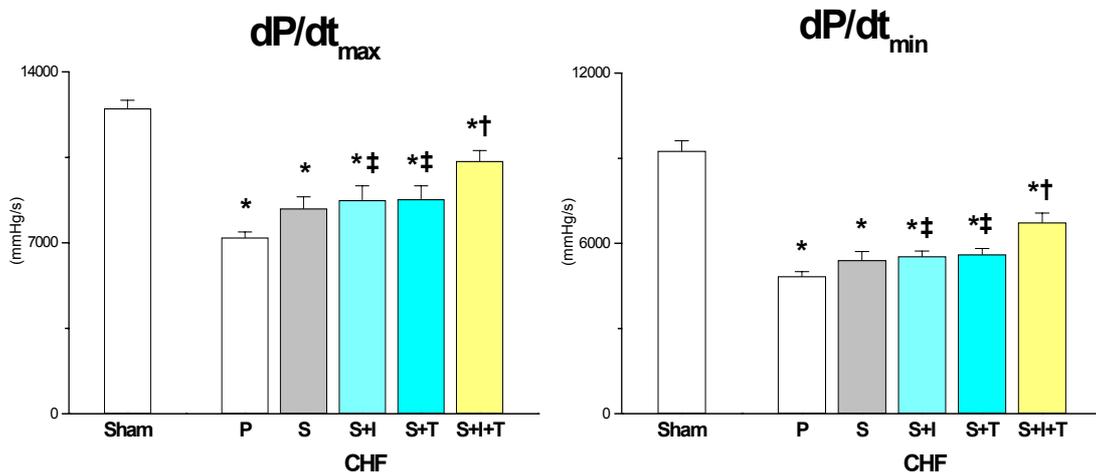


Abbildung 10: Maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt_{max}) bzw. maximale Druckabfallsgeschwindigkeit (dP/dt_{min}) im linken Ventrikel. Gegenüber den scheinoperierten Tieren (Sham) steigt, bzw. fällt der Druck im linken Ventrikel bei den infarzierten Tieren weniger schnell. Unter Behandlung steigen diese Werte wieder an, die Zweifach- und Dreifachtherapie erzielen eine signifikante Verbesserung gegenüber den scheinbehandelten Tieren, wobei die Dreifachblockade des RAAS die besten Erfolge erzielt. (P=Placebo; S=Spironolacton; I=Irbesartan; T=Trandolapril). Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Sham; ‡ $p < 0,05$, † $p < 0,01$ vs. Placebo.

Tabelle 5: Untersuchung hämodynamische Parameter der scheineroperierten (Sham) und der mit Spironolacton (S), Irbesartan (I), Trandolapril (T) oder einer Kombination behandelten herzinsuffizienten Ratten 10 Wochen nach experimentellem Myokardinfarkt. Linksventrikulärer systolischer (LVSP) bzw. linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP), sowie die maximale Anstiegsgeschwindigkeit (dP/dt_{max}) bzw. Abfallsgeschwindigkeit (dP/dt_{min}) des Druckes im linken Ventrikel. Alle Werte als Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Sham; † $p < 0,05$, ‡ $p < 0,01$ vs. Placebo.

	Sham	Herzinsuffiziente Tiere nach Myokardinfarkt behandelt mit				
		Placebo	S	S+I	S+T	S+I+T
LVSP (mmHg)	138 \pm 2	111 \pm 2*	112 \pm 6*	106 \pm 3*	105 \pm 3*	105 \pm 4*
LVEDP (mmHg)	4,2 \pm 0,5	23,6 \pm 2,7*	17,2 \pm 3,8*	15,6 \pm 3,3* †	15,9 \pm 3,1* †	12,7 \pm 2,3 †
dP/dt_{max} (mmHg/s)	12500 \pm 335	7207 \pm 237*	8311 \pm 477*	8734 \pm 600* †	8780 \pm 550* †	10339 \pm 439* †
dP/dt_{min} (mmHg/s)	8845 \pm 440	4831 \pm 172*	5500 \pm 310*	5533 \pm 196* †	5610 \pm 210* †	6130 \pm 234* †

III.3 Linksventrikuläres Kollagen

III.3.1 Linksventrikuläres Kollagen und Kollagen-Volumenfraktion

Der linksventrikuläre Kollagenanteil ist sowohl ausgedrückt als lichtmikroskopische Kollagen-Volumenfraktion als auch über den Hydroxyprolinegehalt berechnetes Kollagen im Trockengewebe (Abbildung 11) bei den herzinsuffizienten mit Placebo behandelten Ratten im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren deutlich erhöht (siehe auch Tabelle 6). Eine Therapie mittels Hemmung des RAAS bringt eine signifikante Verringerung des Kollagenanteils, wobei die Monotherapie mit *Spironolacton* mit der Zweifachtherapie vergleichbare Ergebnisse erzielte. Die Dreifachkombination brachte wiederum die besten Ergebnisse, insbesondere beim gemessenen Kollagengewebeanteil ($p < 0,001$ vs. Placebo).

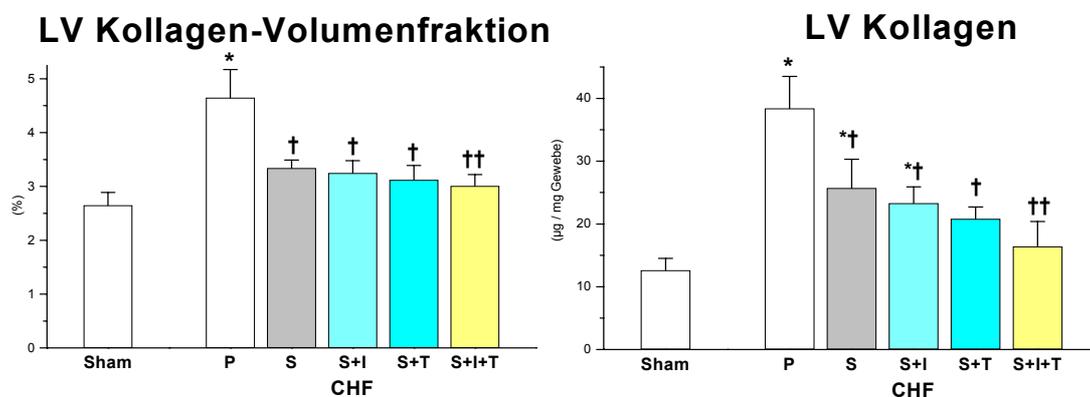


Abbildung 11: Linksventrikuläre Kollagen-Volumenfraktion (%) und linksventrikuläres Gewebekollagen ($\mu\text{g} / \text{mg}$ Gewebe). Der Kollagenanteil im linken Ventrikel ist bei den herzinsuffizienten Tieren deutlich erhöht. Eine Hemmung des RAAS normalisiert den Kollagengehalt, wobei eine Dreifachblockade am effektivsten wirkt. (P=Placebo; S=Spironolacton; I=Irbesartan; T=Trandolapril). Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Sham; † $p < 0,05$, ‡ $p < 0,01$, †† $p < 0,001$ vs. Placebo.

III.3.2 Linksventrikuläre Kollagenexpression

Die linksventrikuläre Kollagen Typ I RNA – Expression (Abbildung 12) ist im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren deutlich erhöht. Nach 9-wöchiger Behandlung reduzierte sich die Expression durch Mono- und Zweifachtherapie signifikant. Durch die vollständige Ausschaltung des RAAS mittels Dreifachkombination aus Aldosteronantagonisten, ACE-Hemmer und AT₁-Rezeptorantagonisten war gegenüber der *Spironolacton*-Monotherapie nochmals eine statistisch signifikante Verminderung der Kollagen Typ I RNA – Expression zu erreichen ($p < 0,05$ vs. *Spironolacton*), siehe auch Tabelle 6.

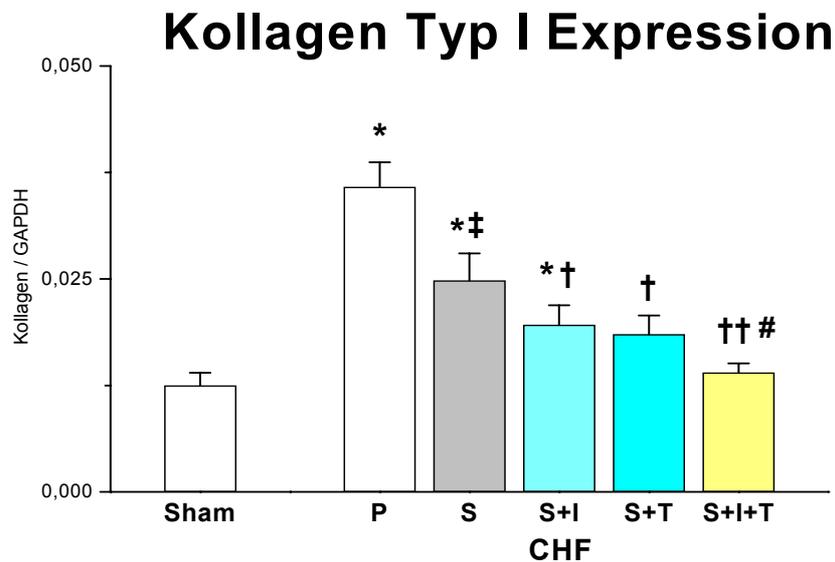


Abbildung 12: RNA-Expression von Kollagen Typ I im linken Ventrikel. Im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren (Sham) sieht man 10 Wochen nach Myokardinfarkt eine deutliche Mehrexpression von Kollagen Typ I bei den herzinsuffizienten Placebo-behandelten Tieren. Die Dreifachkombination aus Spironolacton, ACE-Hemmer und AT₁-Rezeptorantagonisten kann die Expression gegenüber der Spironolacton-Monotherapie nochmals signifikant verbessern. (P=Placebo; S=Spironolacton; I=Irbesartan; T=Trandolapril). Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Sham; ‡ $p < 0,05$, † $p < 0,01$, †† $p < 0,001$ vs. Placebo; # $p < 0,05$ vs S CHF.

Tabelle 6: Bestimmung des linksventrikulären Kollagen mittels Gewichtanteil im Trockengewebe, der Volumenfraktion und der Kollagen Typ I RNA-Expression der scheinoperierten (Sham), mit Spironolacton (S), Irbesartan (I), Trandolapril (T) oder einer Kombination behandelten herzinsuffizienten Ratten 10 Wochen nach experimentellem Myokardinfarkt. Als Housekeeping-Gen bei der Realtime RT-PCR diente Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Alle Werte als Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Sham; † $p < 0,05$, ‡ $p < 0,01$, †† $p < 0,001$ vs. Placebo; # $p < 0,05$ vs. Spiro.

	Sham	Herzinsuffiziente Tiere nach Myokardinfarkt behandelt mit				
		Placebo	S	S+I	S+T	S+I+T
LV Kollagen (μg /mg Trockengewebe)	12,6 \pm 1,9	38,4 \pm 5,1*	25,7 \pm 4,6* ‡	23,3 \pm 2,6* †	20,8 \pm 1,9 †	16,4 \pm 4,8 ††
LV Kollagen-Volumenfraktion (%)	2,65 \pm 0,24	4,65 \pm 0,52*	3,34 \pm 0,15 †	3,25 \pm 0,23 †	3,12 \pm 0,27 †	3,01 \pm 0,21 ††
LV Kollagen Typ I RNA – Expression / GAPDH	0,0125 \pm 0,0015	0,0358 \pm 0,0029 *	0,0248 \pm 0,0032 * ‡	0,0196 \pm 0,0023 * †	0,0185 \pm 0,0022 †	0,014 \pm 0,0011 †† #

III.4 Linksventrikuläre ACE- und ANF-Genexpression

III.4.1 mRNA-Expression des Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE)

Die Genexpression des Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE, Abbildung 13) im überlebendem Myokard war bei Placebo-behandelten Tieren mit Herzinsuffizienz gegenüber den scheinoperierten Tieren erhöht. Die Behandlung mit *Spironolacton* verminderte die ACE-Expression gegenüber den Placebo-Tieren signifikant, wobei die Zwei- und Dreifachblockade des RAAS unter Einschluss des AT₁-Antagonisten in der Hemmung der ACE-Hochregulation der Monotherapie nur leicht überlegen war ($p < 0,01$ vs. Placebo), siehe auch Tabelle 7.

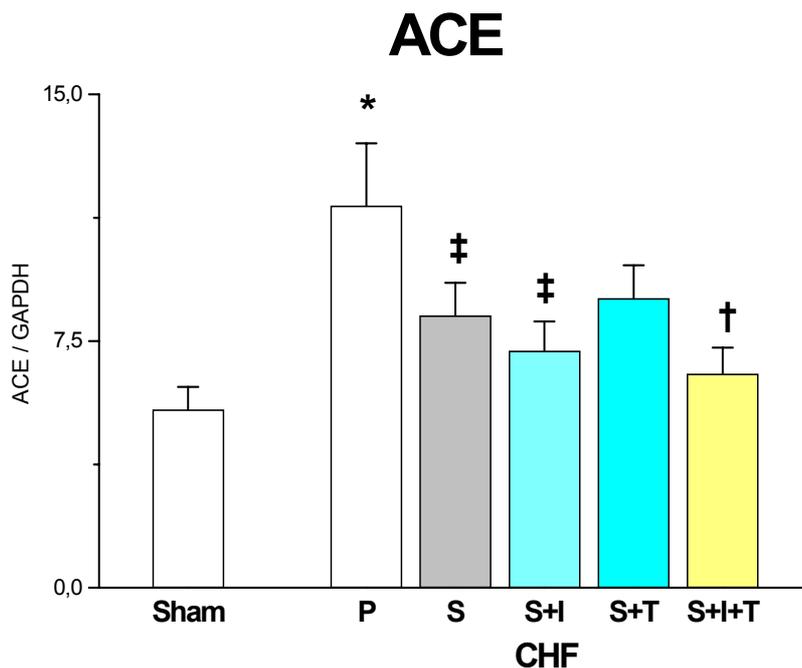


Abbildung 13: Linksventrikuläre mRNA-Expression des Angiotensin-Converting-Enzymes (ACE) 10 Wochen nach Myokardinfarkt. (P=Placebo; S= Spironolacton; I=Irbesartan; T=Trandolapril). Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Sham; ‡ $p < 0,05$, † $p < 0,01$ vs. Placebo.

III.4.2 mRNA-Expression des atrialen natriuretischen Faktors (ANF)

Die mRNA-Expression des atrialen natriuretischen Faktors (ANF, Abbildung 14), wurde als Marker der kardialen Hypertrophie im Rahmen des Remodeling nach Myokardinfarkt untersucht (siehe auch Tabelle 7). Bei den Placebo-behandelten Ratten fand sich deutlich vermehrt ANF-mRNA. Eine Behandlung mit *Spiro* als Monotherapie verminderte die kardiale ANF-Expression, eine weitere Reduktion konnte durch die Kombination mit einem ACE-Hemmer oder einem AT₁-Antagonisten erzielt werden. Durch die Kombination aller drei Wirkstoffe konnte die eindeutigste Reduktion der ANF-Expression erzielt werden ($p < 0,001$ vs. Placebo, $p < 0,05$ vs. *Spiro*).

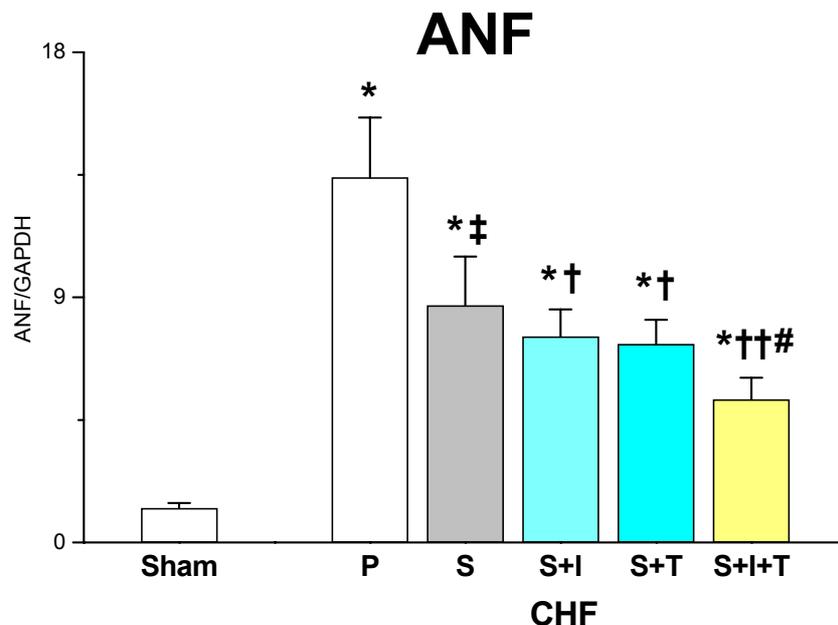


Abbildung 14: Linksventrikuläre mRNA-Expression des atrialen natriuretischen Faktors (ANF) 10 Wochen nach Myokardinfarkt. Blockierung des RAAS vermindert die kardiale ANF-Hochregulierung; der Effekt der Dreifachkombination aus Spiro, Irbesartan und Trandolapril ist am größten ($p < 0,05$ vs. Spiro). (P=Placebo; S= Spiro; I=Irbesartan; T=Trandolapril). Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Sham; ‡ $p < 0,05$, † $p < 0,01$, †† $p < 0,001$ vs. Placebo; # $p < 0,05$ vs S CHF.

Tabelle 7: Bestimmung der linksventrikulären mRNA-Expression mittels Realtime RT-PCR 10 Wochen nach experimentellem Myokardinfarkt bei scheineroperierten (Sham) und herzinsuffizienten, mit Spironolacton (S), Irbesartan (I), Trandolapril (T) oder einer Kombination behandelten Ratten. Es wurde die linksventrikuläre Expression von Kollagen Typ I, Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) und atrialem natriuretischen Faktor (ANF) im überlebenden Myokard bestimmt. Als Housekeeping-Gen diente Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Alle Werte sind Mittelwerte±SEM. * p<0,05 vs. Sham; † p<0,05, ‡ p<0,01, †† p<0,001 vs. Placebo; # p<0,05 vs. Spiro.

	Sham	Herzinsuffiziente Tiere nach Myokardinfarkt behandelt mit				
		Placebo	S	S+I	S+T	S+I+T
LV Kollagen Typ I RNA – Expression / GAPDH	0,0125±0,0015	0,0358±0,0029 *	0,0248±0,0032 * ‡	0,0196±0,0023 * †	0,0185±0,0022 †	0,014±0,0011 †† #
LV ACE mRNA – Expression / GAPDH	5,41±0,7	11,61±1,9*	8,27±1 ‡	7,2±0,9 ‡	8,8±1	6,5±0,8 †
LV ANF mRNA – Expression / GAPDH	1,26±0,19	13,4±2,2*	8,7±1,8* ‡	7,56±1* †	7,28±0,9* †	5,25±0,8 †† #

III.5 Proteinexpression im linken Ventrikel

III.5.1 Sarkoplasmatische retikuläre Calcium-ATPase (Serca 2 ATPase)

Die Expression der sarcoplasmatischen retikulären Calcium-ATPase (Serca 2 ATPase) im linken Ventrikel war bei allen infarzierten Ratten gegenüber den scheinoperierten Tieren (Sham) erniedrigt und wurde durch Zweifach- bzw. Dreifachkombination gegenüber den Placebo-behandelten, herzinsuffizienten Ratten signifikant erhöht. Unter *Spironolacton*-Monotherapie war die Serca 2 ATPase – Expression gegenüber Placebo allerdings nicht signifikant beeinflusst (Abbildung 15).

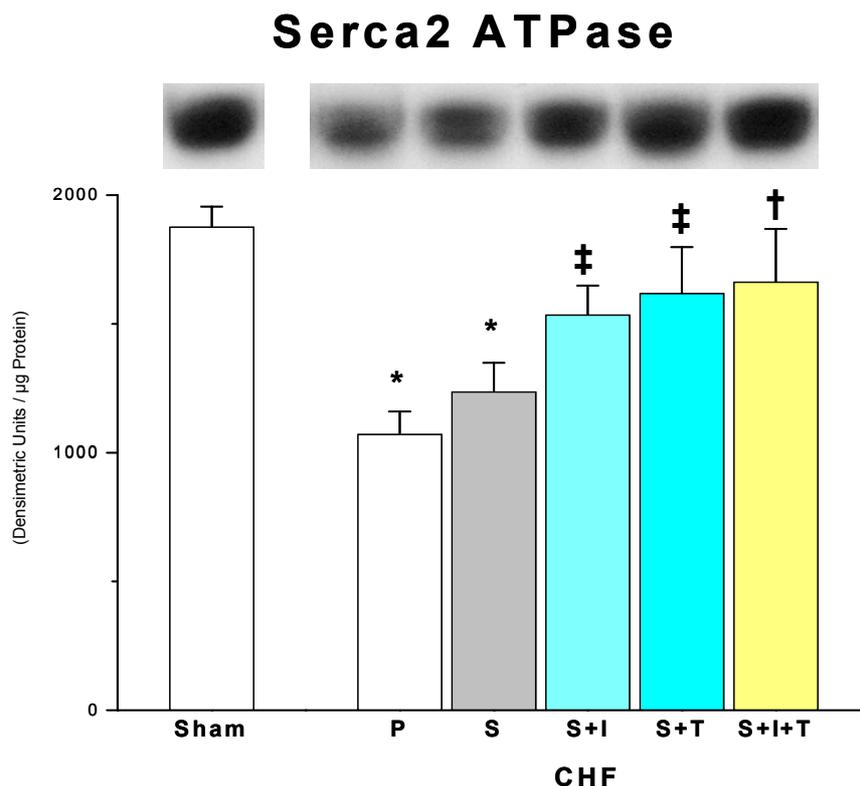


Abbildung 15: Expression der sarcoplasmatischen retikulären Calcium-ATPase (Serca 2 ATPase) im linken Ventrikel 10 Wochen nach Myokardinfarkt. Durch Kombinationsbehandlung wird die bei Placebo-behandelten Tieren supprimierte Serca2 ATPase wieder normalisiert. (P=Placebo; S= Spironolacton; I=Irbesartan; T=Trandolapril). Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Sham; ‡ $p < 0,05$, † $p < 0,01$ vs. Placebo.

III.6 Plasma-Aldosteronspiegel

Die Plasma-Aldosteronbestimmung (Abbildung 16) erfolgte aus Blutproben, die nach der unter Narkose erfolgten Hämodynamikmessung entnommen wurden. Die Entnahme erfolgte 36 Stunden nach der letzten Medikamentengabe. Der Aldosteronspiegel der nur Placebo-behandelten Tiere ist gegenüber den scheinoperierten (*Sham*) Tieren signifikant ($p < 0,05$) erhöht. In den anderen Behandlungsgruppen findet man keine signifikante Abnahme (siehe auch Tabelle 8).

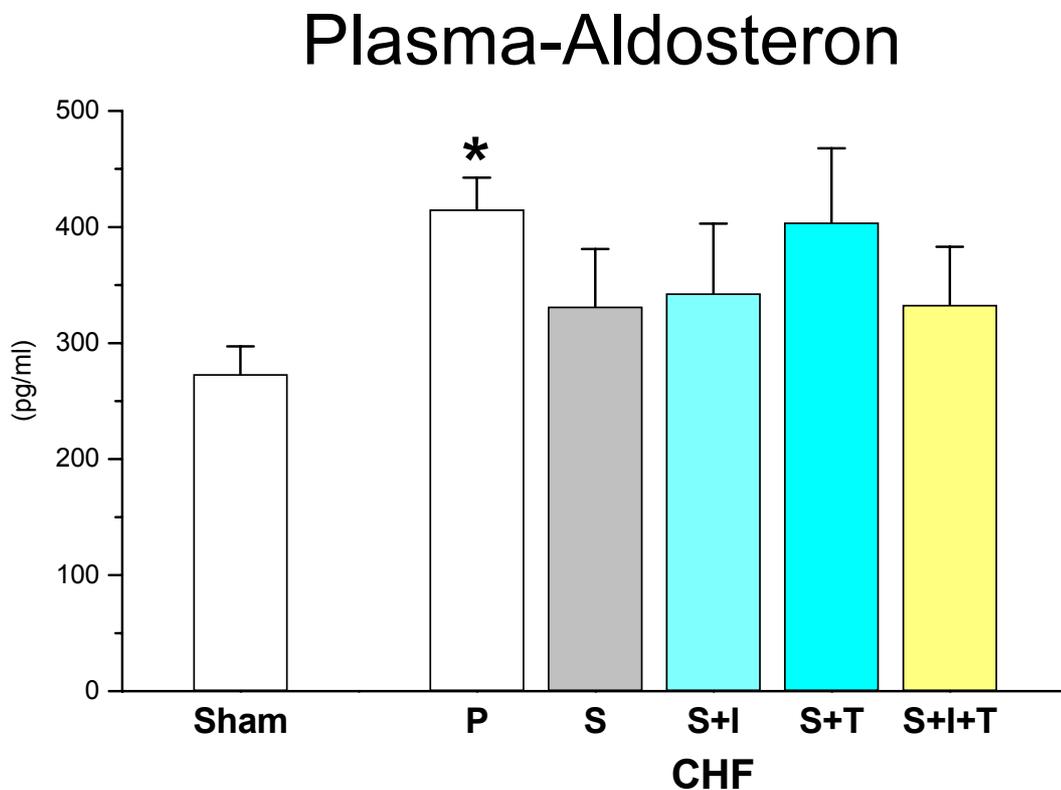


Abbildung 16: Bestimmung des Plasma-Aldosterons aus Blutproben, die in Narkose nach Hämodynamik entnommen wurden. Gegenüber den scheinoperierten Tieren ist der Plasma-Aldosteronspiegel bei den Placebo-behandelten Tieren signifikant erhöht. Behandlung mit Inhibitoren scheint den Plasma-Aldosteronspiegel tendenziell nur leicht zu vermindern. (P=Placebo; S= Spironolacton; I=Irbesartan; T=Trandolapril). Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Sham.

III.7 Plasmaelektrolyte

Die Elektrolyte (Natrium, Kalium) wurden aus Plasma bestimmt, das im Rahmen der Hämodynamik nach 9-wöchiger Behandlung abgenommen wurde. Sämtliche Medikamente wurden 36 Stunden vor der Probenentnahme abgesetzt. Weder beim Natrium- noch beim Kaliumspiegel fand sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen (siehe Abbildung 17). Das Kalium war bei keiner Gruppe, insbesondere auch nicht der Dreifachtherapie aus Spironolacton, AT₁-Rezeptorantagonist und ACE-Hemmer über den Normbereich erhöht (siehe auch Tabelle 8).

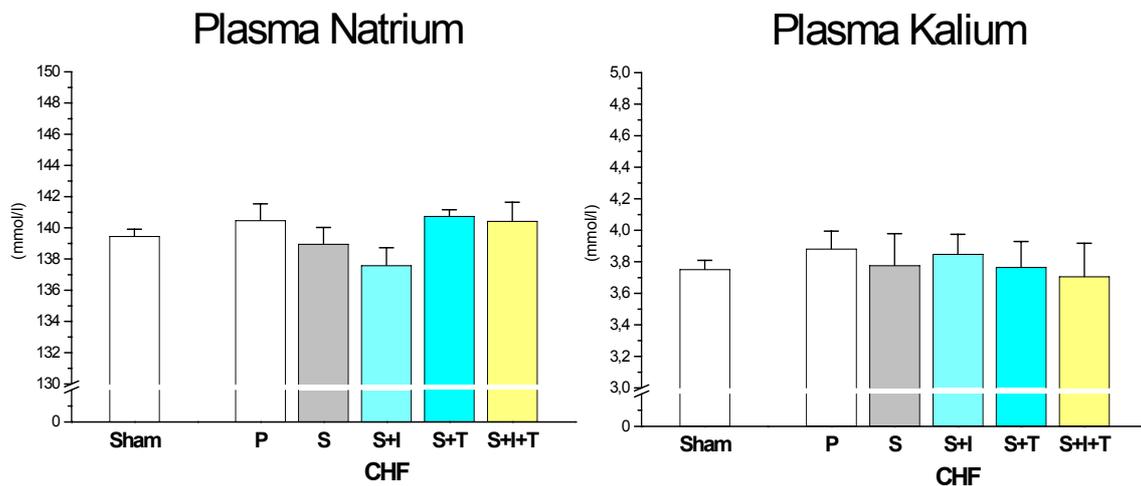


Abbildung 17: Natrium- und Kaliumspiegel im Plasma 10 Wochen nach experimentellem Myokardinfarkt. Sämtliche Medikamente wurden 36 Stunden vor Probenentnahme abgesetzt. Weder für den Natrium- noch den Kaliumspiegel besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen. (P=Placebo; S= Spironolacton; I=Irbesartan; T=Trandolapril). Mittelwerte \pm SEM.

*Tabelle 8: Blutplasmaspiegel für Natrium, Kalium und Aldosteron. Die Blutproben der scheinoperierten (Sham), mit Spironolacton (S), Irbesartan (I), Trandolapril (T) oder einer Kombination behandelten herzinsuffizienten Ratten wurden am Ende der 9 wöchigen Behandlungsphase nach 36 stündigem Intervall zur letzten Medikamentengabe unter Narkose entnommen. Alle Werte sind Mittelwerte±SEM. * p<0,05 vs. Sham.*

	Sham	Herzinsuffiziente Tiere nach Myokardinfarkt behandelt mit				
		Placebo	S	S+I	S+T	S+I+T
Natrium (mmol / l)	139,5±0,4	140,5±1	139±1	137,6±1,1	140,8±0,4	140,5±1,3
Kalium (mmol / l)	3,7±0,1	3,9±0,1	3,8±0,2	3,8±0,1	3,8±0,2	3,7±0,1
Aldosteron (pg / ml)	273±24	415±27 *	331±50	343±60	404±64	333±50

IV DISKUSSION

Ziel dieser Studie war es festzustellen, ob eine Dreifachinhibition des RAAS mittels ACE-Hemmer, AT₁-Rezeptorantagonisten und *Spironolacton* das kardiale Remodeling bei Ratten nach Herzinfarkt erfolgreicher verhindert als eine Mono- oder Zweifachtherapie. Um kleinere Infarkte nach experimenteller Koronarligation mit entsprechend geringer ausgeprägter kardialer Dysfunktion (101) auszuschließen, gingen nur Tiere mit planimetrisch ausgedehnten Infarkten (>45%) in die Studie ein.

Die Rationale einer zusätzlichen Blockade der Aldosteronwirkung, dem Endglied des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems, nach Myokardinfarkt beruht auf zahlreichen klinischen und experimentellen Beobachtungen einer persistierenden, durch Mineralokortikoidrezeptorblockade hemmbaren, Aldosteronwirkung trotz Blockade vorgeschalteter Stufen des RAAS. Auch fand man, dass ein erhöhtes Plasma-Aldosteron ein negativer Indikator für die Prognose einer Herzinsuffizienz ist (132). Erklärungsmodelle für die persistierenden Aldosteroneffekte trotz Hemmung des RAAS sind der „Aldosteron-Escape“ (105), der „Angiotensin–Aldosteron–Circulus vitiosus“ (110) oder die AT II unabhängige de novo Aldosteronsynthese (98).

„Aldosteron-Escape“ wird das trotz Blockade des RAAS auftretende Phänomen einer Wiederzunahme des Plasma-Aldosterons sogar über den Ausgangspegel hinaus nach initialer Abnahme genannt (26, 117). Selbst bei der Kombination aus hochdosiertem ACE-Hemmer und AT₁-Antagonisten kam es in klinischen Studien nach einem anfänglichen Abfall des Plasma-Aldosterons zu einem Wiedererreichen des Ausgangsniveaus (86). Möglicherweise ist das durch ACE-Hemmer und AT₁-Blocker ansteigende Kalium der sekretogene Reiz für das vermehrte Plasma-Aldosteron. Insbesondere wird außerdem vermutet, dass auch eine lokale Gewebsproduktion am Aldosteron-Escape beteiligt ist, und so den zusätzlichen Schutz des myokardialen Gewebes vor den schädlichen Aldosteronwirkungen erforderlich macht. Die Gabe von Mineralokortikoidantagonisten zusätzlich zur Blockade des RAAS hätte so also

Eine Mineralokortikoidrezeptorinhibitor kann so also neben der Blockierung der Aldosteronwirkungen auch eine quasi „zusätzliche“ ACE-Hemmung durch Durchbrechen der Selbstverstärkung bewirken.

Tatsächlich fanden wir auch in dieser Studie eine nach Infarkt signifikant erhöhte ACE-Genexpression. Dies steht in Einklang mit der Literatur, denn die ACE-Expression nicht nur des Gefäßgewebes, sondern auch der Myofibroblasten, der Myozyten und einwandernder Makrophagen ist bei Herzinsuffizienz erhöht und wird als eine der ersten Komponenten des lokalen RAAS nach Myokardinfarkt hochreguliert (36). Zwar konnte die Therapie mittels ACE-Hemmer oder AT₁-Blocker die ACE-Expression wieder vermindern, am höchsten signifikant gelang dies jedoch mittels Dreifachinhibition des RAAS.

Ferner gibt es auch Hinweise auf eine AT II-unabhängige Aldosteronproduktion: Katada et al. konnten zeigen, dass es selbst bei Angiotensin II Typ_{1A}-Rezeptor Knockoutmäusen nach Herzinfarkt im Vergleich zum Wildtyp zwar ein schwächeres, aber immer noch signifikantes Remodeling mit Hypertrophie und kardiale Dysfunktion gibt (68). Auch die Genexpression der Aldosteronsynthese und der kardiale Aldosteronspiegel blieb bei den AT_{1A}-Knockoutmäusen erhöht, während sich die Plasmaspiegel nicht signifikant veränderten. Behandlung mit *Spirolacton* normalisierte jedoch dieses Remodeling. Eine Behandlung mit einem ACE-Hemmer hingegen brachte keinen zusätzlichen Benefit bei den Knockoutmäusen, was vermuten lässt, dass es bei den Umbauvorgängen nach Myokardinfarkt zumindest zum Teil um Angiotensin II-unabhängige Mechanismen handelt. Insgesamt scheint so die alleinige Blockade der Renin-Angiotensin-Achse nicht auszureichen, um die kardiale Aldosteronproduktion und das Remodeling nach Myokardinfarkt zu verhindern. Auch existieren von Angiotensin II unabhängige Mechanismen zur Aktivierung der intrakardialen Aldosteronsynthese.

Auch bei unseren Versuchstieren fanden sich nach Infarzierung signifikant erhöhte Plasma-Aldosteronspiegel als Zeichen eines aktivierten RAAS, die durch ACE-Hemmer oder AT₁-Blocker nicht signifikant gesenkt werden konnten. Dies unterstreicht die Notwendigkeit einer additiven Mineralokortikoidrezeptor-

blockade mittels *Spironolacton*, um die negativen Aldosteroneffekte am kardio-
vaskulären System zu mildern.

Der verwendete Angiotensin II Typ₁ –Rezeptorblocker *Irbesartan* blockiert se-
lektiv die Wirkungen des Angiotensin II, und zwar unabhängig, ob es sich um
über ACE-generiertes oder um über ACE-unabhängiges generiertes Angio-
tensin (96, 138, 143) handelt. Eine selektive AT₁-Rezeptorblockade müsste dem-
zufolge theoretisch einen größeren Benefit als ein ACE-Hemmer bringen.
Zusätzlich wurde vermehrt über AT₂-Rezeptor (oder andere Subtypen) vermit-
telte, protektive Effekte berichtet (1, 2, 6, 19, 64, 76, 89). In klinischen Studien
schieden AT₁-Rezeptorantagonisten aber meist nicht besser ab als ACE-Hem-
mer (16, 33, 102, 106). Die Entstehungswege und Angriffspunkte von Angio-
tensin II im Herzen sind in Abbildung 19 zusammengefasst.

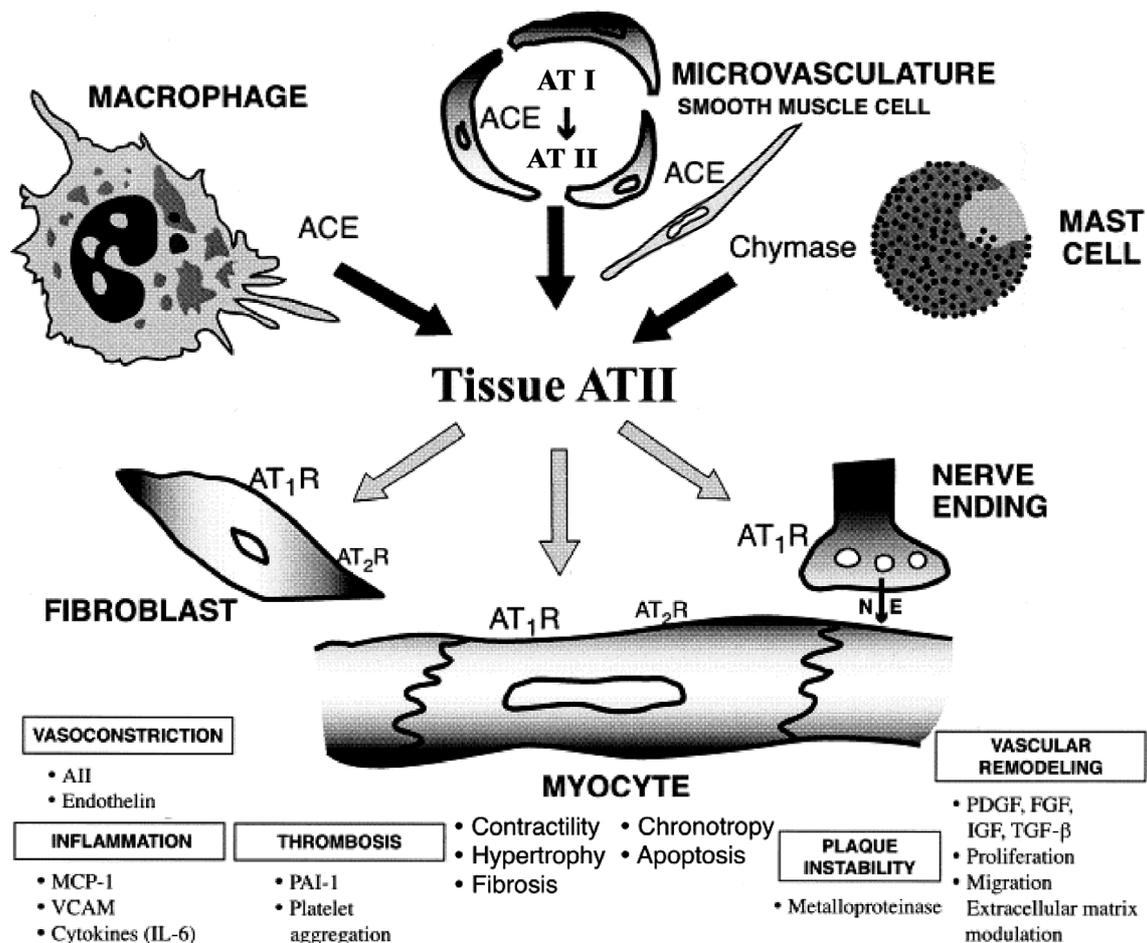


Abbildung 19: Entstehung und Angriffspunkte des Angiotensin II (ATII) im Herzen. AT₁R =
Angiotensin II Typ 1 Rezeptor; AT₂R = Angiotensin II Typ 2 Rezeptor; NE = Noradrenalin. Nach
Dzau (36).

Die Wirkung von *Irbesartan* ist stark dosisabhängig; in dieser Studie wurde eine vorbeschriebene, hohe Dosierung von 50mg/kg KG am Tag verwendet (114). Der in dieser Studie verwendete ACE-Hemmer *Trandolapril* hemmt das im RAAS ein Stufe früher stehende Angiotensin-Converting-Enzyme sowie zusätzlich den Abbau des potenten endothelialen Vasodilatators Bradykinin, der neben blutdrucksenkenden auch positive Wirkungen auf Gerinnung, Fibrose und Zellwachstum hat (124, 147). Allerdings ist der Anstieg von Bradykinin höchstwahrscheinlich aber auch für die Nebenwirkungen der ACE-Hemmer wie Ausschlag, trockener Reizhusten und Angioödem verantwortlich. Die positiven Effekte einer ACE-Blockade wurden sowohl bei herzinsuffizienten Patienten (75), bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit (39) oder Myokardinfarkt (73, 101, 133, 158) beschrieben, und einem verminderten Remodeling sowie verminderter Vor- und Nachlast zugeschrieben. Einschränkend zu unserer Studie muss man feststellen, dass die von uns gesehenen positiven Effekte der Kombinationstherapie zumindest zum Teil auch durch eine von uns nicht untersuchte Reduktion der Vor- und / oder Nachlast verursacht worden sein könnten. Zusammenfassend sind die positiven Resultate der ACE-Blockade bei Dysfunktion, Herzinsuffizienz und Myokardinfarkt aber nicht nur hämodynamische Effekte, sondern zum Großteil durch lokal protektive Effekte von Gewebe-ACE in Gefäßen und Herzgewebe bedingt (37). *Trandolapril* senkt den Blutdruck ungefähr 10 mal effektiver als *Enalapril* (24), und wurde in dieser Studie wie vorbeschrieben (10, 41) in einer Dosierung von 0,3mg/kg KG pro Tag gegeben. Der Aldosteronrezeptorantagonist *Spirolacton* verhindert die Bindung erhöhter Aldosteronspiegel an Mineralokortikoidrezeptoren und komplementiert damit die Blockierung des RAAS. Am Herzen hat Aldosteron vielfältige Effekte, insbesondere im Rahmen des Remodlings: Auf eine gesteigerte Hypertrophie (77, 93, 99, 116), gesteigerte Fibroblastenproliferation und Kollagensynthese (141-143) wurde schon hingewiesen. Darüber hinaus kann Aldosteron über Calcineurin-abhängige Signalwege direkt proapoptotisch wirken (85), Thrombozyten aktivieren (118), Entzündung und oxidativen Stress verursachen (150), oder, wie auch Angiotensin II, eine endotheliale Dysfunktion (47) und in der Folge Atherosklerose bewirken: Aldosteron erhöht die Aktivität der

NAD(P)H-Oxidase und die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (112), vermindert die protektive endotheliale NO-Produktion über die Verminderung des Co-Faktors *Tetrahydrobiopterin* und stimuliert den *Nukleären Faktor-κβ* (109). Des Weiteren kann eine Blockade der Mineralokortikoide mittels des selektiven Mineralokortikoid-Antagonisten *Eplerenon* z.B. die deletäre Expression des *LOX-1* Rezeptors vermindern, der über Adhäsionsmoleküle eine wichtige Rolle in der Genese der Atherosklerose spielt (72). Aldosteron kann weiterhin neben Elektrolytverschiebungen intrakardiale Aktionspotentiale verändern (136), durch intrakardiale Fibrose eine inhomoge Reizweiterleitung bewirken und somit für maligne Arrhythmien mitverantwortlich sein (152). Eine Zusammenfassung der schädlichen Aldosteronwirkungen zeigt Abbildung 20. In dieser Studie sollten die deletären Aldosteroneffekte am kardiovaskulären System durch eine Gabe von 10mg/kg KG *Spironolacton* pro Tag verhindert werden.

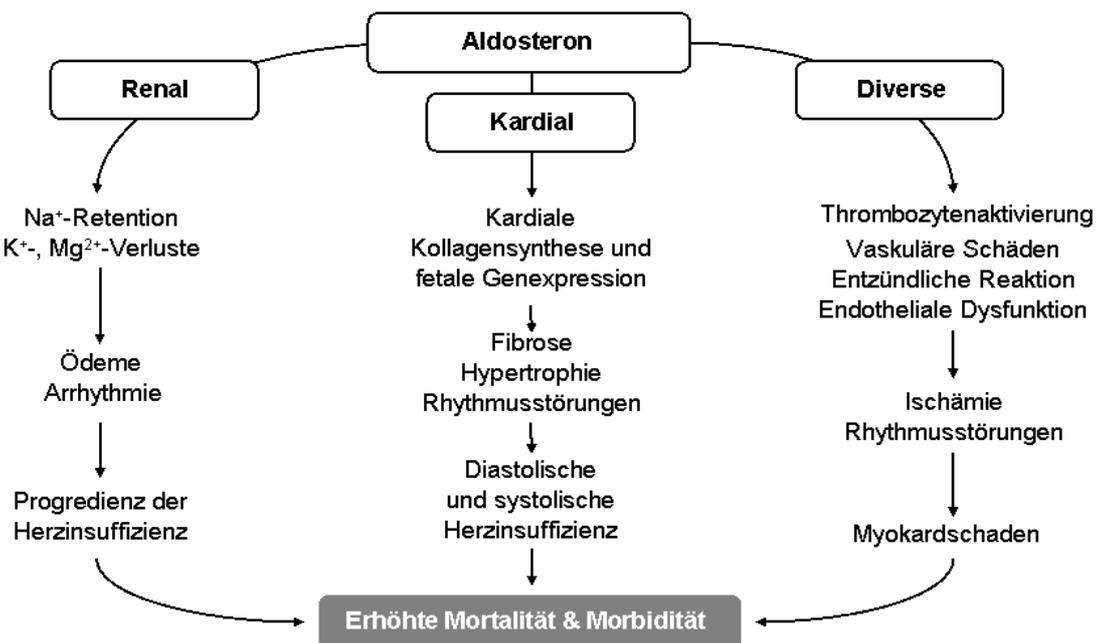


Abbildung 20: Schädliche Aldosteronwirkungen im Bezug auf kardiale Mortalität und Morbidität. Nach Bauersachs (12).

Die bei den Ratten verwendeten Dosen von *Trandolapril*, *Spironolacton* und *Irbesartan* sind im Vergleich zum Menschen sehr hoch, trotzdem handelt es sich um in Studien zur Herzinsuffizienz bei Ratten übliche Dosierungen (8, 10, 41, 42, 47).

Im Einklang mit Überlegungen einer möglichst vollständigen Blockade des RAAS fanden wir bei den in unserer Studie untersuchten Markern des Remodeling bzw. der ventrikulären Dysfunktion bessere Ergebnisse durch eine Dreifachkombination von ACE-Hemmer, AT₁-Blocker und MR-Antagonist:

Kardiale natriuretische Faktoren (z.B. der Atriale Natriuretische Faktor, ANF oder auch das Brain Natriuretic Peptid, BNP) sind etablierte Marker für kardiale Hypertrophie und Herzinsuffizienz. Die Expression dieser Peptide ist im linken Ventrikel in einem Patientenkollektiv mit Herzinsuffizienz erhöht, und korreliert mit dem Schweregrad der Herzinsuffizienz (17, 52). In der vorliegenden Studie war die Genexpression des linksventrikulären ANF bei den placebobehandelten, herzinsuffizienten Tieren signifikant erhöht und ließ sich am besten durch die Dreifachkombination normalisieren, was sich als Hinweis auf eine geringere Hypertrophie und ventrikuläre Dysfunktion deuten lässt. Selbiges gilt für die Expression der Serca2-ATPase, von der gezeigt wurde, dass sie im versagenden menschlichen Herzen reduziert ist (56, 82), und die in unserer Studie am besten durch Tripeltherapie normalisiert wurde.

Diesen Trend bestätigen auch die erhobenen hämodynamischen Daten. Alle Tiere hatten nach Infarzierung eine gegenüber den scheinoperierten Tieren signifikant erniedrigten linksventrikulären systolischen Druck (LVSP) sowie einen erhöhten linksventrikulären enddiastolischen Druck (LVEDP) als Zeichen einer kardialen Dysfunktion. Auch die maximale Anstiegssteilheit des linksventrikulären Druckes (dP/dt_{max}) bzw. die Druckabfallsgeschwindigkeit (dP/dt_{min}) waren deutlich vermindert, was für eine Störung der Kontraktion und Relaxation spricht. Insbesondere die Dreifachkombination konnte die kardiale Dysfunktion gegenüber Placebo am effektivsten verbessern.

Ursächlich für die ventrikuläre Dysfunktion könnte unter anderem auch eine vermehrte linksventrikuläre Fibrosierung sein, denn Aldosteron stimuliert die Kollagensynthese entweder direkt über Mineralokortikoidrezeptoren (20, 22) oder

indirekt über eine Sensibilisierung von AT₁-Rezeptoren für Angiotensin II (21, 156). In dieser Studie konnte die Tripeltherapie mit Aldosteronantagonist die Expression des kardialen Kollagen Typ I effektiver als die Mono- oder Zweifachtherapie reduzieren, was zeigt, dass die Fibrose nach Myokardinfarkt am besten durch eine möglichst vollständige Blockierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems verhindert werden kann. Eine durch Aldosteronblockade befürchtete negative Beeinflussung der Infarktheilung mit Störung der reparativen Narbenentstehung, nachfolgender Ruptur oder Aneurysmbildung, sowie Infarktausdehnung konnte von verschiedenen Autoren nicht beobachtet werden (32, 58, 110). Tatsächlich konnte in einer Folgeanalyse der *EPHESUS*-Daten, bei der die Patienten im Mittel am siebten Tag nach akutem Myokardinfarkt mit *Eplerenon* behandelt wurden, schon 30 Tage nach Infarkt eine Reduktion der Mortalität um 31% ($p=0,004$) bzw. der kardiovaskulären Mortalität um 32% ($p=0,003$) gefunden werden (110). Interessanterweise kam dieser Benefit sogar bei Patienten, die optimal mit ACE-Hemmer oder AT-II Antagonist, Betablocker, Statin, Aspirin und koronarer Reperfusion vorbehandelt waren, zum Tragen. Während wir in unserem Modell erst 10 Tage nach Koronarligation mit der Medikation begonnen haben, um einen Einfluss der Medikation auf die resultierende Infarktgröße zu minimieren und viel mehr die Auswirkungen auf das Remodeling im chronischem Myokardinfarktmodell zu untersuchen, konnten Hayashi et al. zeigen, dass ein selbst ein früher Mineralokortikoidantagonismus direkt nach Revaskularisierung sicher und sinnvoll ist (58).

Als weiteren Marker einer verbesserten linksventrikulären Funktion haben wir unter Dreifachtherapie ein gegenüber der Zweifachtherapie signifikant geringeres rechtsventrikuläres Gewicht gesehen. Die rechtsventrikuläre Hypertrophie nach Koronarligation bei Ratten ist eine Folge des versagenden linken Ventrikels sowie volumen- und druckunabhängigen Faktoren wie einem aktivierten systemischen und lokalen Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (94). Die rechtsventrikuläre Hypertrophie wird daher von verschiedenen Autoren als Marker einer Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt bzw. seine Veränderung als Index verschiedener kardioprotektiver Interventionen vorgeschlagen (74, 124).

Eine als Nebenwirkung der Dreifachhemmung des RAAS befürchtete Hyperkaliämie konnten wir bei unseren Versuchstieren nicht nachweisen, während in der *RALES*-Population ernste Hyperkaliämien (≥ 6 mmol/l) mit 1 vs 2% (105), in der *EPHESUS*-Population mit 3,9 vs 5,5% (108) signifikant häufiger auftraten. In einer kleinen Unterpopulation der *CHARM-Added*-Studie (Placebo oder *Candesartan* zusätzlich zu einem ACE-Hemmer in einer Population mit Herzinsuffizienz und geringer LVEF) betrug die Hyperkaliämierate von mit ACE-Hemmern und MR-Antagonisten vorbehandelten Patienten 1%, bei zusätzlicher Gabe eines AT_1 -Blockers stieg sie auf 4% (87). Neuere Studien deuten sogar darauf hin, dass die Rate ernster Hyperkaliämien unter Aldosteronantagonisten höher als in der Population von *EPHESUS* oder *RALES* sein könnte (66). Mögliche Erklärungen dafür wären, dass die Studienpatienten meist älter und kränker waren und zusätzlich an Begleiterkrankungen wie Nierenfunktionsstörungen oder Diabetes litten. Bei unseren, sonst gesunden Tieren ohne Vorschädigung, hätte sich jedoch keine Niereninsuffizienz im Beobachtungszeitraum entwickeln können. Auch betrug das Intervall zwischen letzter Medikamentengabe und Blutentnahme bei der Hämodynamikmessung 36 Stunden, so dass eventuell pharmakologisch bedingte Elektrolytverschiebungen schon wieder ausgeglichen waren.

In *RALES* fand sich der größte Benefit bei Patienten mit erhöhten Markern für kardiales Remodeling (155), weshalb für die Reduzierung der Herzinsuffizienz-mortalität vor allem das verminderte linksventrikuläre Remodeling durch Mineralokortikoidantagonismus verantwortlich gemacht wird. Experimentell wird diese These neben dieser Untersuchung auch von einer Vielzahl weiterer experimenteller Studien, die den Einfluss einer zusätzlichen Aldosteronblockade auf das Remodeling trotz ACE-Blockade bestätigen, untermauert (5, 8, 10, 11, 41, 46, 55, 67, 118, 119). Auch wir fanden in dieser Studie einen zusätzlichen Benefit durch die Dreifachinhibition des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems.

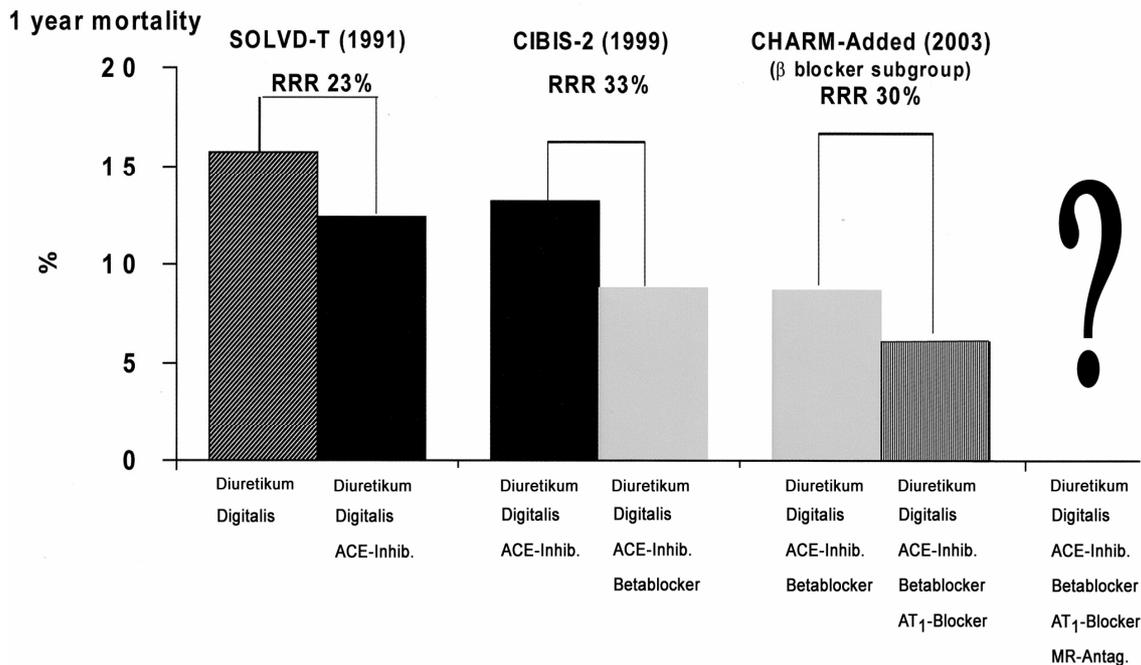


Abbildung 21: Fortschritte in der Behandlung der Herzinsuffizienz durch Kombinationstherapie anhand der Sterblichkeit. Durch möglichst vollständige neurohumorale Blockade kann eine relative Risikoreduktion (RRR) gegenüber der alleinigen Therapie mittels Digitalis und Diuretika erzielt werden. Zur Kombination von ACE-Hemmer, AT₁-Blocker und MR-Antagonisten liegen noch keine Ergebnisse vor. Nach McMurray (88).

Die Hemmung des adrenergen Systems durch Betablocker bei Herzinsuffizienz ist ein seit Jahren etabliertes Therapiekonzept (63, 134): In Metaanalysen konnte gezeigt werden, dass die Therapie mit Betablockern bei CHF die Gesamtmortalität um bis zu 32% reduzieren kann (35, 60, 78). Auch positive Effekte auf das kardiale Remodeling durch Betablockade sind beschrieben (54, 113). Auf die gegenseitige Aktivierung des RAAS und des adrenergen Systems wurde schon hingewiesen (157). Somit könnte durch die Kombination von Betablockern, ACE-Hemmern, AT₁-Rezeptorblockern und Mineralokortikoidrezeptorantagonisten eine bestmögliche Blockade des RAAS erreicht werden. Ob diese „Vierfachtherapie“ tatsächlich Vorteile in der Herzinsuffizienztherapie bringt, für welche Patienten sie geeignet ist, und vor allem, ob sie klinisch sicher ist, sollte in weiteren Studien geklärt werden.

V ZUSAMMENFASSUNG

Bei Ratten mit chronischen Myokardinfarkt wurde der Einfluss des Mineralokortikoidrezeptor (MR)-Antagonisten *Spironolacton* alleine und in Kombination mit einem Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE)-Hemmer oder einem Angiotensin II Typ 1 (AT₁)-Antagonisten, bzw. der Kombination aller drei Medikamente auf das kardiale Remodeling untersucht.

Ab dem zehnten Tag nach Koronarligatur wurden die Tiere für neun Wochen mit Placebo (P), *Spironolacton* (S, 10mg/kg/d), den Kombinationen aus *Spironolacton* und *Trandolapril* (S+T; T:0,3mg/kg/d), *Spironolacton* und *Irbesartan* (S+I, I: 50mg/kg/d) bzw. der Dreifachkombination aus *Spironolacton*, *Irbesartan* und *Trandolapril* (S+I+T) behandelt. Die Infarktgröße war in allen Behandlungsgruppen vergleichbar.

Eine intensivierete Blockade des Renin–Angiotensin–Aldosteron–Systems (RAAS) mittels Dreifachkombination (S+I+T) verbesserte die linksventrikuläre Dilatation und Fibrose am effektivsten. Die Kollagen Typ I RNA–Expression und die Expression des atrialen natriuretischen Faktors war bei S+I+T signifikant niedriger als bei P ($p < 0,001$) oder als bei S ($p < 0,05$). Auch die sarcoplasmatische retikuläre Calcium-ATPase- und die ACE-Expression verbesserten sich unter S+I+T mehr als unter Mono- oder Zweifachtherapie. Diese positiven Effekte zeigten sich auch in einem verbesserten linksventrikulären systolischen und enddiastolischen Druck (P $23,6 \pm 2,7$ vs. S+I+T $12,7 \pm 2,3$ mmHg), einer höheren maximalen Druckanstiegsgeschwindigkeit bzw. maximalen Druckabfallsgeschwindigkeit des linken Ventrikels bei S+I+T. Das rechtsventrikuläre Gewicht konnte durch S+I+T gegenüber der P-Gruppe ($p < 0,001$) sowie der S-Gruppe ($p < 0,05$) hochsignifikant gesenkt werden.

Die vorliegende Studie analysiert erstmals systematisch eine Dreifachinhibition des RAAS im Rattenmodell der Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt. Das kardiale Remodeling konnte am effektivsten durch die Kombination aus ACE-Hemmer, AT₁-Antagonist und MR-Blocker verhindert werden. Systematische klinische Untersuchungen hierzu stehen allerdings noch aus.

VI LITERATUR

1. Adachi, Y., Saito, Y., Kishimoto, I., Harada, M., Kuwahara, K., Takahashi, N., Kawakami, R., Nakanishi, M., Nakagawa, Y., Tanimoto, K., Saitoh, Y., Yasuno, S., Usami, S., Iwai, M., Horiuchi, M., Nakao, K., Angiotensin II type 2 receptor deficiency exacerbates heart failure and reduces survival after acute myocardial infarction in mice. *Circulation*, 2003. 107: p. 2406-8.
2. Akishita, M., Yamada, H., Dzau, V. J., Horiuchi, M., Increased vasoconstrictor response of the mouse lacking angiotensin II type 2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. 261: p. 345-9.
3. Alzamora, R., Michea, L., Marusic, E. T., Role of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in nongenomic aldosterone effects in human arteries. *Hypertension*, 2000. 35: p. 1099-104.
4. Anand, I. S., Liu, D., Chugh, S. S., Prahash, A. J., Gupta, S., John, R., Popescu, F., Chandrashekar, Y., Isolated myocyte contractile function is normal in postinfarct remodeled rat heart with systolic dysfunction. *Circulation*, 1997. 96: p. 3974-84.
5. Barr, C. S., Lang, C. C., Hanson, J., Arnott, M., Kennedy, N., Struthers, A. D., Effects of adding spironolactone to an angiotensin-converting enzyme inhibitor in chronic congestive heart failure secondary to coronary artery disease. *Am J Cardiol*, 1995. 76: p. 1259-65.
6. Batenburg, W. W., Garrelds, I. M., Bernasconi, C. C., Juillerat-Jeanneret, L., van Kats, J. P., Saxena, P. R., Danser, A. H., Angiotensin II type 2 receptor-mediated vasodilation in human coronary microarteries. *Circulation*, 2004. 109: p. 2296-301.
7. Bauersachs, J., Fraccarollo, D., Ertl, G., ACE-inhibition and endothelin-antagonism for endothelial dysfunction in heart failure: Mono- or combination therapy. *European Heart Journal*, 2000. 21: p. 301.
8. Bauersachs, J., Fraccarollo, D., Ertl, G., Gretz, N., Wehling, M., Christ, M., Striking increase of natriuresis by low-dose spironolactone in congestive heart failure only in combination with ACE inhibition: mechanistic evidence to support RALES. *Circulation*, 2000. 102: p. 2325-8.

9. Bauersachs, J., Fraccarollo, D., Schafer, A., Ertl, G., Angiotensin-converting enzyme inhibition and endothelin antagonism for endothelial dysfunction in heart failure: mono-or combination therapy. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2002. 40: p. 594-600.
10. Bauersachs, J., Heck, M., Fraccarollo, D., Hildemann, S. K., Ertl, G., Wehling, M., Christ, M., Addition of spironolactone to angiotensin-converting enzyme inhibition in heart failure improves endothelial vasomotor dysfunction: role of vascular superoxide anion formation and endothelial nitric oxide synthase expression. *J Am Coll Cardiol*, 2002. 39: p. 351-8.
11. Bauersachs, J., Fraccarollo, D., Aldosterone antagonism in addition to angiotensin-converting enzyme inhibitors in heart failure. *Minerva Cardioangiol*, 2003. 51: p. 155-64.
12. Bauersachs, J., Aldosterone antagonism in heart failure: improvement of cardiac remodelling, endothelial dysfunction and platelet activation. *Eur J Clin Invest*, 2004. 34: p. 649-52.
13. Bech, O. M., Kahr, O., Diamant, B., Steiness, E., Time course of functional deterioration after coronary artery ligation in rats. *Cardiovasc Res*, 1989. 23: p. 649-54.
14. Beltrami, A. P., Urbanek, K., Kajstura, J., Yan, S. M., Finato, N., Bussani, R., Nadal-Ginard, B., Silvestri, F., Leri, A., Beltrami, C. A., Anversa, P., Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med*, 2001. 344: p. 1750-7.
15. Beltrami, A. P., Barlucchi, L., Torella, D., Baker, M., Limana, F., Chimenti, S., Kasahara, H., Rota, M., Musso, E., Urbanek, K., Leri, A., Kajstura, J., Nadal-Ginard, B., Anversa, P., Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*, 2003. 114: p. 763-76.
16. Berry, C., Norrie, J., McMurray, J. J., Are angiotensin II receptor blockers more efficacious than placebo in heart failure? Implications of ELITE-2. Evaluation of Losartan In The Elderly. *Am J Cardiol*, 2001. 87: p. 606-7, A9.
17. Bonow, R. O., New insights into the cardiac natriuretic peptides. *Circulation*, 1996. 93: p. 1946-50.
18. Boudreau, N. J., Jones, P. L., Extracellular matrix and integrin signalling: the shape of things to come. *Biochem J*, 1999. 339 (Pt 3): p. 481-8.

19. Bove, C. M., Gilson, W. D., Scott, C. D., Epstein, F. H., Yang, Z., Dimaria, J. M., Berr, S. S., French, B. A., Bishop, S. P., Kramer, C. M., The angiotensin II type 2 receptor and improved adjacent region function post-MI. *J Cardiovasc Magn Reson*, 2005. 7: p. 459-64.
20. Brilla, C. G., Rupp, H., Funck, R., Maisch, B., The renin-angiotensin-aldosterone system and myocardial collagen matrix remodelling in congestive heart failure. *Eur Heart J*, 1995. 16 Suppl O: p. 107-9.
21. Brilla, C. G., Scheer, C., Rupp, H., Renin-angiotensin system and myocardial collagen matrix: modulation of cardiac fibroblast function by angiotensin II type 1 receptor antagonism. *J Hypertens Suppl*, 1997. 15: p. S13-9.
22. Brilla, C. G., Renin-angiotensin-aldosterone system and myocardial fibrosis. *Cardiovasc Res*, 2000. 47: p. 1-3.
23. Bristow, M. R., Ginsburg, R., Minobe, W., Cubicciotti, R. S., Sageman, W. S., Lurie, K., Billingham, M. E., Harrison, D. C., Stinson, E. B., Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med*, 1982. 307: p. 205-11.
24. Brown, N. L., Badel, M. Y., Benzoni, F., Zanirato, J., Vincent, J. C., Fichelle, J., Worcel, M., Angiotensin-converting enzyme inhibition, anti-hypertensive activity and hemodynamic profile of trandolapril (RU 44570). *Eur J Pharmacol*, 1988. 148: p. 79-91.
25. Burlew, B. S., Weber, K. T., Connective tissue and the heart. Functional significance and regulatory mechanisms. *Cardiol Clin*, 2000. 18: p. 435-42.
26. Cicoira, M., Zanolla, L., Franceschini, L., Rossi, A., Golia, G., Zeni, P., Caruso, B., Zardini, P., Relation of aldosterone "escape" despite angiotensin-converting enzyme inhibitor administration to impaired exercise capacity in chronic congestive heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol*, 2002. 89: p. 403-7.
27. Cohn, J. N., Levine, T. B., Olivari, M. T., Garberg, V., Lura, D., Francis, G. S., Simon, A. B., Rector, T., Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med*, 1984. 311: p. 819-23.
28. Cohn, J. N., Ferrari, R., Sharpe, N., Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on

- cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol*, 2000. 35: p. 569-82.
29. Davies, E., Ye, P., Kenyon, C. J., MacKenzie, S. M., Fraser, R., Ryding, A., Mullins, J. J., Gray, G., Dominiczak, A. F., Connell, J. M. C., Does aldosterone have a place in our hearts? International Aldosterone Conference, New Orleans, 2004: p. 19-21.
 30. DeFelice, A., Frering, R., Horan, P., Time course of hemodynamic changes in rats with healed severe myocardial infarction. *Am J Physiol*, 1989. 257: p. H289-96.
 31. Delcayre, C., Swynghedauw, B., Molecular mechanisms of myocardial remodeling. The role of aldosterone. *J Mol Cell Cardiol*, 2002. 34: p. 1577-84.
 32. Delyani, J. A., Robinson, E. L., Rudolph, A. E., Effect of a selective aldosterone receptor antagonist in myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001. 281: p. H647-54.
 33. Dickstein, K., Kjekshus, J., Effects of losartan and captopril on mortality and morbidity in high-risk patients after acute myocardial infarction: the OPTIMAAL randomised trial. *Optimal Trial in Myocardial Infarction with Angiotensin II Antagonist Losartan. Lancet*, 2002. 360: p. 752-60.
 34. Ding, B., Price, R. L., Goldsmith, E. C., Borg, T. K., Yan, X., Douglas, P. S., Weinberg, E. O., Bartunek, J., Thielen, T., Didenko, V. V., Lorell, B. H., Left ventricular hypertrophy in ascending aortic stenosis mice: anoikis and the progression to early failure. *Circulation*, 2000. 101: p. 2854-62.
 35. Doughty, R. N., Rodgers, A., Sharpe, N., MacMahon, S., Effects of beta-blocker therapy on mortality in patients with heart failure. A systematic overview of randomized controlled trials. *Eur Heart J*, 1997. 18: p. 560-5.
 36. Dzau, V. J., Bernstein, K., Celermajer, D., Cohen, J., Dahlof, B., Deanfield, J., Diez, J., Drexler, H., Ferrari, R., van Gilst, W., Hansson, L., Hornig, B., Husain, A., Johnston, C., Lazar, H., Lonn, E., Luscher, T., Mancini, J., Mimran, A., Pepine, C., Rabelink, T., Remme, W., Ruilope, L., Ruzicka, M., Schunkert, H., Swedberg, K., Unger, T., Vaughan, D., Weber, M., The relevance of tissue angiotensin-converting enzyme: manifestations in mechanistic and endpoint data. *Am J Cardiol*, 2001. 88: p. 1L-20L.
 37. Dzau, V. J., Bernstein, K., Celermajer, D., Cohen, J., Dahlof, B., Deanfield, J., Diez, J., Drexler, H., Ferrari, R., Van Gilst, W., Hansson, L.,

- Hornig, B., Husain, A., Johnston, C., Lazar, H., Lonn, E., Luscher, T., Mancini, J., Mimran, A., Pepine, C., Rabelink, T., Remme, W., Ruilope, L., Ruzicka, M., Schunkert, H., Swedberg, K., Unger, T., Vaughan, D., Weber, M., Pathophysiologic and therapeutic importance of tissue ACE: a consensus report. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2002. 16: p. 149-60.
38. Edwards, C. A., O'Brien, W. D., Jr., Modified assay for determination of hydroxyproline in a tissue hydrolyzate. *Clin Chim Acta*, 1980. 104: p. 161-7.
39. Fox, K. M., Henderson, J. R., Bertrand, M. E., Ferrari, R., Remme, W. J., Simoons, M. L., The European trial on reduction of cardiac events with perindopril in stable coronary artery disease (EUROPA). *Eur Heart J*, 1998. 19 Suppl J: p. J52-5.
40. Fraccarollo, D., Bauersachs, J., Kellner, M., Galuppo, P., Ertl, G., Cardioprotection by long-term ET(A) receptor blockade and ACE inhibition in rats with congestive heart failure: mono- versus combination therapy. *Cardiovasc Res*, 2002. 54: p. 85-94.
41. Fraccarollo, D., Galuppo, P., Hildemann, S., Christ, M., Ertl, G., Bauersachs, J., Additive improvement of left ventricular remodeling and neurohormonal activation by aldosterone receptor blockade with eplerenone and ACE inhibition in rats with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 2003. 42: p. 1666-73.
42. Fraccarollo, D., Galuppo, P., Schmidt, I., Ertl, G., Bauersachs, J., Additive amelioration of left ventricular remodeling and molecular alterations by combined aldosterone and angiotensin receptor blockade after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*, 2005. 67: p. 97-105.
43. Francis, J., Weiss, R. M., Wei, S. G., Johnson, A. K., Felder, R. B., Progression of heart failure after myocardial infarction in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2001. 281: p. R1734-45.
44. Funder, J. W., Cardiac synthesis of aldosterone: going, going, gone...? *Endocrinology*, 2004. 145: p. 4793-5.
45. Funder, J. W., The nongenomic actions of aldosterone. *Endocr Rev*, 2005. 26: p. 313-21.
46. Galuppo P, Fraccarollo, D., Gimmler C, Hildemann S, Bauersachs J., Long-term selective aldosterone receptor blockade and ACE inhibition in rat heart failure: effects on neurohormonal activation and cardiac molecular alterations. *Z Kardiol* 2003, 2003. 92(suppl 1): p. 115.

47. Garnier, A., Bendall, J. K., Fuchs, S., Escoubet, B., Rochais, F., Hoerter, J., Nehme, J., Ambroisine, M. L., De Angelis, N., Morineau, G., d'Estienne, P., Fischmeister, R., Heymes, C., Pinet, F., Delcayre, C., Cardiac specific increase in aldosterone production induces coronary dysfunction in aldosterone synthase-transgenic mice. *Circulation*, 2004. 110: p. 1819-25.
48. Gerdes, A. M., Cardiac myocyte remodeling in hypertrophy and progression to failure. *J Card Fail*, 2002. 8: p. S264-8.
49. Gibson, U. E., Heid, C. A., Williams, P. M., A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res*, 1996. 6: p. 995-1001.
50. Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., Mathieu, C., An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, 2001. 25: p. 386-401.
51. Gomez-Sanchez, E. P., Ahmad, N., Romero, D. G., Gomez-Sanchez, C. E., Origin of aldosterone in the rat heart. *Endocrinology*, 2004. 145: p. 4796-802.
52. Gottlieb, S. S., Kukin, M. L., Ahern, D., Packer, M., Prognostic importance of atrial natriuretic peptide in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 1989. 13: p. 1534-9.
53. Gottlieb, S. S., McCarter, R. J., Vogel, R. A., Effect of beta-blockade on mortality among high-risk and low-risk patients after myocardial infarction. *N Engl J Med*, 1998. 339: p. 489-97.
54. Groenning, B. A., Nilsson, J. C., Sondergaard, L., Fritz-Hansen, T., Larsson, H. B., Hildebrandt, P. R., Antiremodeling effects on the left ventricle during beta-blockade with metoprolol in the treatment of chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 2000. 36: p. 2072-80.
55. Harada, E., Yoshimura, M., Yasue, H., Nakagawa, O., Nakagawa, M., Harada, M., Mizuno, Y., Nakayama, M., Shimasaki, Y., Ito, T., Nakamura, S., Kuwahara, K., Saito, Y., Nakao, K., Ogawa, H., Aldosterone induces angiotensin-converting-enzyme gene expression in cultured neonatal rat cardiocytes. *Circulation*, 2001. 104: p. 137-9.
56. Hasenfuss, G., Reinecke, H., Studer, R., Meyer, M., Pieske, B., Holtz, J., Holubarsch, C., Posival, H., Just, H., Drexler, H., Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res*, 1994. 75: p. 434-42.

57. Haseroth, K., Gerdes, D., Berger, S., Feuring, M., Gunther, A., Herbst, C., Christ, M., Wehling, M., Rapid nongenomic effects of aldosterone in mineralocorticoid-receptor-knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. 266: p. 257-61.
58. Hayashi, M., Tsutamoto, T., Wada, A., Tsutsui, T., Ishii, C., Ohno, K., Fujii, M., Taniguchi, A., Hamatani, T., Nozato, Y., Kataoka, K., Morigami, N., Ohnishi, M., Kinoshita, M., Horie, M., Immediate Administration of Mineralocorticoid Receptor Antagonist Spironolactone Prevents Post-Infarct Left Ventricular Remodeling Associated With Suppression of a Marker of Myocardial Collagen Synthesis in Patients With First Anterior Acute Myocardial Infarction. *Circulation*, 2003.
59. Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., Williams, P. M., Real time quantitative PCR. *Genome Res*, 1996. 6: p. 986-94.
60. Heidenreich, P. A., Lee, T. T., Massie, B. M., Effect of beta-blockade on mortality in patients with heart failure: a meta-analysis of randomized clinical trials. *J Am Coll Cardiol*, 1997. 30: p. 27-34.
61. Hermann, F., Ruschitzka, F. T., Schiffrin, E. L., Clinical trials report. CHARM-Added Trial. *Curr Hypertens Rep*, 2004. 6: p. 47.
62. Houser, S. R., Margulies, K. B., Is depressed myocyte contractility centrally involved in heart failure? *Circ Res*, 2003. 92: p. 350-8.
63. Hunt, S. A., Baker, D. W., Chin, M. H., Cinquegrani, M. P., Feldman, A. M., Francis, G. S., Ganiats, T. G., Goldstein, S., Gregoratos, G., Jessup, M. L., Noble, R. J., Packer, M., Silver, M. A., Stevenson, L. W., Gibbons, R. J., Antman, E. M., Alpert, J. S., Faxon, D. P., Fuster, V., Jacobs, A. K., Hiratzka, L. F., Russell, R. O., Smith, S. C., Jr., ACC/AHA guidelines for the evaluation and management of chronic heart failure in the adult: executive summary. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to revise the 1995 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure). *J Am Coll Cardiol*, 2001. 38: p. 2101-13.
64. Ichihara, S., Senbonmatsu, T., Price, E., Jr., Ichiki, T., Gaffney, F. A., Inagami, T., Targeted deletion of angiotensin II type 2 receptor caused cardiac rupture after acute myocardial infarction. *Circulation*, 2002. 106: p. 2244-9.
65. Jorde, U. P., Vittorio, T., Katz, S. D., Colombo, P. C., Latif, F., Le Jemtel, T. H., Elevated plasma aldosterone levels despite complete inhibition of

- the vascular angiotensin-converting enzyme in chronic heart failure. *Circulation*, 2002. 106: p. 1055-7.
66. Juurlink, D. N., Mamdani, M. M., Lee, D. S., Kopp, A., Austin, P. C., Laupacis, A., Redelmeier, D. A., Rates of hyperkalemia after publication of the Randomized Aldactone Evaluation Study. *N Engl J Med*, 2004. 351: p. 543-51.
 67. Kambara, A., Holycross, B. J., Wung, P., Schanbacher, B., Ghosh, S., McCune, S. A., Bauer, J. A., Kwiatkowski, P., Combined effects of low-dose oral spironolactone and captopril therapy in a rat model of spontaneous hypertension and heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2003. 41: p. 830-7.
 68. Katada, J., Meguro, T., Saito, H., Ohashi, A., Anzai, T., Ogawa, S., Yoshikawa, T., Persistent cardiac aldosterone synthesis in angiotensin II type 1A receptor-knockout mice after myocardial infarction. *Circulation*, 2005. 111: p. 2157-64.
 69. Kato, S., Spinale, F. G., Tanaka, R., Johnson, W., Cooper, G. T., Zile, M. R., Inhibition of collagen cross-linking: effects on fibrillar collagen and ventricular diastolic function. *Am J Physiol*, 1995. 269: p. H863-8.
 70. Ke, L. D., Chen, Z., Yung, W. K., A reliability test of standard-based quantitative PCR: exogenous vs endogenous standards. *Mol Cell Probes*, 2000. 14: p. 127-35.
 71. Knaapen, M. W., Davies, M. J., De Bie, M., Haven, A. J., Martinet, W., Kockx, M. M., Apoptotic versus autophagic cell death in heart failure. *Cardiovasc Res*, 2001. 51: p. 304-12.
 72. Kobayashi, N., Hara, K., Tojo, A., Onozato, M. L., Honda, T., Yoshida, K., Mita, S., Nakano, S., Tsubokou, Y., Matsuoka, H., Eplerenone shows renoprotective effect by reducing LOX-1-mediated adhesion molecule, PKCepsilon-MAPK-p90RSK, and Rho-kinase pathway. *Hypertension*, 2005. 45: p. 538-44.
 73. Kober, L., Torp-Pedersen, C., Carlsen, J. E., Bagger, H., Eliassen, P., Lyngborg, K., Videbaek, J., Cole, D. S., Auclert, L., Pauly, N. C., A clinical trial of the angiotensin-converting-enzyme inhibitor trandolapril in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Trandolapril Cardiac Evaluation (TRACE) Study Group. *N Engl J Med*, 1995. 333: p. 1670-6.

74. Konorev, L. A., Myocardial infarct in rats: right ventricular hypertrophy as a criterion of postinfarct left ventricular heart failure. *Biull Eksp Biol Med*, 1989. 107: p. 655-7.
75. Konstam, M. A., Rousseau, M. F., Kronenberg, M. W., Udelson, J. E., Melin, J., Stewart, D., Dolan, N., Edens, T. R., Ahn, S., Kinan, D. et al., Effects of the angiotensin converting enzyme inhibitor enalapril on the long-term progression of left ventricular dysfunction in patients with heart failure. *SOLVD Investigators. Circulation*, 1992. 86: p. 431-8.
76. Kurisu, S., Ozono, R., Oshima, T., Kambe, M., Ishida, T., Sugino, H., Matsuura, H., Chayama, K., Teranishi, Y., Iba, O., Amano, K., Matsubara, H., Cardiac angiotensin II type 2 receptor activates the kinin/NO system and inhibits fibrosis. *Hypertension*, 2003. 41: p. 99-107.
77. Kuster, G. M., Kotlyar, E., Rude, M. K., Siwik, D. A., Liao, R., Colucci, W. S., Sam, F., Mineralocorticoid receptor inhibition ameliorates the transition to myocardial failure and decreases oxidative stress and inflammation in mice with chronic pressure overload. *Circulation*, 2005. 111: p. 420-7.
78. Lechat, P., Packer, M., Chalon, S., Cucherat, M., Arab, T., Boissel, J. P., Clinical effects of beta-adrenergic blockade in chronic heart failure: a meta-analysis of double-blind, placebo-controlled, randomized trials. *Circulation*, 1998. 98: p. 1184-91.
79. Litwin, S. E., Katz, S. E., Morgan, J. P., Douglas, P. S., Serial echocardiographic assessment of left ventricular geometry and function after large myocardial infarction in the rat. *Circulation*, 1994. 89: p. 345-54.
80. Lopes, J. D., Gomes, R. A., Hial, V., Lopes, I. C., Reis, M. A., Teixeira Vde, P., Correlations between the collagen content of the human left ventricular myocardium, measured by biochemical and morphometric methods. *Arq Bras Cardiol*, 2002. 79: p. 10-9.
81. Lopez-Sendon, J., Swedberg, K., McMurray, J., Tamargo, J., Maggioni, A. P., Dargie, H., Tendera, M., Waagstein, F., Kjekshus, J., Lechat, P., Torp-Pedersen, C., Expert consensus document on beta-adrenergic receptor blockers. *Eur Heart J*, 2004. 25: p. 1341-62.
82. Lowes, B. D., Gilbert, E. M., Abraham, W. T., Minobe, W. A., Larrabee, P., Ferguson, D., Wolfel, E. E., Lindenfeld, J., Tsvetkova, T., Robertson, A. D., Quaipe, R. A., Bristow, M. R., Myocardial gene expression in dilated cardiomyopathy treated with beta-blocking agents. *N Engl J Med*, 2002. 346: p. 1357-65.

83. Mani, K., Kitsis, R. N., Myocyte apoptosis: programming ventricular remodeling. *J Am Coll Cardiol*, 2003. 41: p. 761-4.
84. Mann, D. L., Kent, R. L., Parsons, B., Cooper, G. T., Adrenergic effects on the biology of the adult mammalian cardiocyte. *Circulation*, 1992. 85: p. 790-804.
85. Mano, A., Tatsumi, T., Shiraishi, J., Keira, N., Nomura, T., Takeda, M., Nishikawa, S., Yamanaka, S., Matoba, S., Kobara, M., Tanaka, H., Shirayama, T., Takamatsu, T., Nozawa, Y., Matsubara, H., Aldosterone directly induces myocyte apoptosis through calcineurin-dependent pathways. *Circulation*, 2004. 110: p. 317-23.
86. McKelvie, R. S., Yusuf, S., Pericak, D., Avezum, A., Burns, R. J., Probstfield, J., Tsuyuki, R. T., White, M., Rouleau, J., Latini, R., Maggioni, A., Young, J., Pogue, J., Comparison of candesartan, enalapril, and their combination in congestive heart failure: randomized evaluation of strategies for left ventricular dysfunction (RESOLVD) pilot study. The RESOLVD Pilot Study Investigators. *Circulation*, 1999. 100: p. 1056-64.
87. McMurray, J. J., Ostergren, J., Swedberg, K., Granger, C. B., Held, P., Michelson, E. L., Olofsson, B., Yusuf, S., Pfeffer, M. A., Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and reduced left-ventricular systolic function taking angiotensin-converting-enzyme inhibitors: the CHARM-Added trial. *Lancet*, 2003. 362: p. 767-71.
88. McMurray, J. J., Pfeffer, M. A., Swedberg, K., Dzau, V. J., Which inhibitor of the renin-angiotensin system should be used in chronic heart failure and acute myocardial infarction? *Circulation*, 2004. 110: p. 3281-8.
89. Metcalfe, B. L., Huentelman, M. J., Parilak, L. D., Taylor, D. G., Katovich, M. J., Knot, H. J., Sumners, C., Raizada, M. K., Prevention of cardiac hypertrophy by angiotensin II type-2 receptor gene transfer. *Hypertension*, 2004. 43: p. 1233-8.
90. Michea, L., Delpiano, A. M., Hitschfeld, C., Lobos, L., Lavandero, S., Marusic, E. T., Eplerenone blocks nongenomic effects of aldosterone on the Na⁺/H⁺ exchanger, intracellular Ca²⁺ levels, and vasoconstriction in mesenteric resistance vessels. *Endocrinology*, 2005. 146: p. 973-80.
91. Mihailidou, A. S., Funder, J. W., Nongenomic effects of mineralocorticoid receptor activation in the cardiovascular system. *Steroids*, 2005. 70: p. 347-51.

92. Mizuno, Y., Yoshimura, M., Yasue, H., Sakamoto, T., Ogawa, H., Kugiyama, K., Harada, E., Nakayama, M., Nakamura, S., Ito, T., Shimasaki, Y., Saito, Y., Nakao, K., Aldosterone production is activated in failing ventricle in humans. *Circulation*, 2001. 103: p. 72-7.
93. Modena, M. G., Aveta, P., Menozzi, A., Rossi, R., Aldosterone inhibition limits collagen synthesis and progressive left ventricular enlargement after anterior myocardial infarction. *Am Heart J*, 2001. 141: p. 41-6.
94. Nahrendorf, M., Hu, K., Fraccarollo, D., Hiller, K. H., Haase, A., Bauer, W. R., Ertl, G., Time course of right ventricular remodeling in rats with experimental myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003. 284: p. H241-8.
95. Nishikawa, N., Yamamoto, K., Sakata, Y., Mano, T., Yoshida, J., Miwa, T., Takeda, H., Hori, M., Masuyama, T., Differential activation of matrix metalloproteinases in heart failure with and without ventricular dilatation. *Cardiovasc Res*, 2003. 57: p. 766-74.
96. Nishimura, H., Buikema, H., Baltatu, O., Ganten, D., Urata, H., Functional evidence for alternative ANG II-forming pathways in hamster cardiovascular system. *Am J Physiol*, 1998. 275: p. H1307-12.
97. Okubo, S., Niimura, F., Nishimura, H., Takemoto, F., Fogo, A., Matsusaka, T., Ichikawa, I., Angiotensin-independent mechanism for aldosterone synthesis during chronic extracellular fluid volume depletion. *J Clin Invest*, 1997. 99: p. 855-60.
98. Olivetti, G., Capasso, J. M., Sonnenblick, E. H., Anversa, P., Side-to-side slippage of myocytes participates in ventricular wall remodeling acutely after myocardial infarction in rats. *Circ Res*, 1990. 67: p. 23-34.
99. Perrier, E., Kerfant, B. G., Lalevee, N., Bideaux, P., Rossier, M. F., Richard, S., Gomez, A. M., Benitah, J. P., Mineralocorticoid receptor antagonism prevents the electrical remodeling that precedes cellular hypertrophy after myocardial infarction. *Circulation*, 2004. 110: p. 776-83.
100. Pfeffer, M. A., Pfeffer, J. M., Fishbein, M. C., Fletcher, P. J., Spadaro, J., Kloner, R. A., Braunwald, E., Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res*, 1979. 44: p. 503-12.
101. Pfeffer, M. A., Braunwald, E., Moye, L. A., Basta, L., Brown, E. J., Jr., Cuddy, T. E., Davis, B. R., Geltman, E. M., Goldman, S., Flaker, G. C. et al., Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival

and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. *N Engl J Med*, 1992. 327: p. 669-77.

102. Pfeffer, M. A., McMurray, J. J., Velazquez, E. J., Rouleau, J. L., Kober, L., Maggioni, A. P., Solomon, S. D., Swedberg, K., Van de Werf, F., White, H., Leimberger, J. D., Henis, M., Edwards, S., Zelenkofske, S., Sellers, M. A., Califf, R. M., Valsartan, captopril, or both in myocardial infarction complicated by heart failure, left ventricular dysfunction, or both. *N Engl J Med*, 2003. 349: p. 1893-906.
103. Pickering, J. G., Boughner, D. R., Quantification of myocardial collagen using polarized light microscopy and computer-assisted image analysis. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 1989. 21: p. S83.
104. Pitt, B., "Escape" of aldosterone production in patients with left ventricular dysfunction treated with an angiotensin converting enzyme inhibitor: implications for therapy. *Cardiovasc Drugs Ther*, 1995. 9: p. 145-9.
105. Pitt, B., Zannad, F., Remme, W. J., Cody, R., Castaigne, A., Perez, A., Palensky, J., Wittes, J., The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med*, 1999. 341: p. 709-17.
106. Pitt, B., Poole-Wilson, P. A., Segal, R., Martinez, F. A., Dickstein, K., Camm, A. J., Konstam, M. A., Riegger, G., Klingler, G. H., Neaton, J., Sharma, D., Thiyagarajan, B., Effect of losartan compared with captopril on mortality in patients with symptomatic heart failure: randomised trial--the Losartan Heart Failure Survival Study ELITE II. *Lancet*, 2000. 355: p. 1582-7.
107. Pitt, B., Williams, G., Remme, W., Martinez, F., Lopez-Sendon, J., Zannad, F., Neaton, J., Roniker, B., Hurley, S., Burns, D., Bittman, R., Kleiman, J., The EPHEsus trial: eplerenone in patients with heart failure due to systolic dysfunction complicating acute myocardial infarction. Eplerenone Post-AMI Heart Failure Efficacy and Survival Study. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2001. 15: p. 79-87.
108. Pitt, B., Remme, W., Zannad, F., Neaton, J., Martinez, F., Roniker, B., Bittman, R., Hurley, S., Kleiman, J., Gattlin, M., Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med*, 2003. 348: p. 1309-21.
109. Pitt, B., A new HOPE for aldosterone blockade? *Circulation*, 2004. 110: p. 1714-6.

110. Pitt, B., White, H., Nicolau, J., Martinez, F., Gheorghide, M., Aschermann, M., van Veldhuisen, D. J., Zannad, F., Krum, H., Mukherjee, R., Vincent, J., Eplerenone reduces mortality 30 days after randomization following acute myocardial infarction in patients with left ventricular systolic dysfunction and heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 2005. 46: p. 425-31.
111. Quaini, F., Urbanek, K., Beltrami, A. P., Finato, N., Beltrami, C. A., Nadal-Ginard, B., Kajstura, J., Leri, A., Anversa, P., Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med*, 2002. 346: p. 5-15.
112. Rajagopalan, S., Duquaine, D., King, S., Pitt, B., Patel, P., Mineralocorticoid receptor antagonism in experimental atherosclerosis. *Circulation*, 2002. 105: p. 2212-6.
113. Remme, W. J., Riegger, G., Hildebrandt, P., Komajda, M., Jaarsma, W., Bobbio, M., Soler-Soler, J., Scherhag, A., Lutiger, B., Ryden, L., The benefits of early combination treatment of carvedilol and an ACE-inhibitor in mild heart failure and left ventricular systolic dysfunction. The carvedilol and ACE-inhibitor remodelling mild heart failure evaluation trial (CARMEN). *Cardiovasc Drugs Ther*, 2004. 18: p. 57-66.
114. Richer, C., Fornes, P., Cazaubon, C., Domergue, V., Nisato, D., Giudicelli, J. F., Effects of long-term angiotensin II AT1 receptor blockade on survival, hemodynamics and cardiac remodeling in chronic heart failure in rats. *Cardiovasc Res*, 1999. 41: p. 100-8.
115. Ross, R. S., Pham, C., Shai, S. Y., Goldhaber, J. I., Fenczik, C., Glembotski, C. C., Ginsberg, M. H., Loftus, J. C., Beta1 integrins participate in the hypertrophic response of rat ventricular myocytes. *Circ Res*, 1998. 82: p. 1160-72.
116. Sato, A., Suzuki, Y., Saruta, T., Effects of spironolactone and angiotensin-converting enzyme inhibitor on left ventricular hypertrophy in patients with essential hypertension. *Hypertens Res*, 1999. 22: p. 17-22.
117. Sato, A., Saruta, T., Aldosterone breakthrough during angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy. *Am J Hypertens*, 2003. 16: p. 781-8.
118. Schafer, A., Fraccarollo, D., Hildemann, S., Christ, M., Eigenthaler, M., Kobsar, A., Walter, U., Bauersachs, J., Inhibition of platelet activation in congestive heart failure by aldosterone receptor antagonism and ACE inhibition. *Thromb Haemost*, 2003. 89: p. 1024-30.

119. Schafer, A., Fraccarollo, D., Hildemann, S. K., Tas, P., Ertl, G., Bauersachs, J., Addition of the selective aldosterone receptor antagonist eplerenone to ACE inhibition in heart failure: effect on endothelial dysfunction. *Cardiovasc Res*, 2003. 58: p. 655-62.
120. Schrier, R. W., Abraham, W. T., Hormones and hemodynamics in heart failure. *N Engl J Med*, 1999. 341: p. 577-85.
121. Silvestre, J. S., Robert, V., Heymes, C., Aupetit-Faisant, B., Mouas, C., Moalic, J. M., Swynghedauw, B., Delcayre, C., Myocardial production of aldosterone and corticosterone in the rat. Physiological regulation. *J Biol Chem*, 1998. 273: p. 4883-91.
122. Silvestre, J. S., Heymes, C., Oubenaissa, A., Robert, V., Aupetit-Faisant, B., Carayon, A., Swynghedauw, B., Delcayre, C., Activation of cardiac aldosterone production in rat myocardial infarction: effect of angiotensin II receptor blockade and role in cardiac fibrosis. *Circulation*, 1999. 99: p. 2694-701.
123. Slight, S. H., Joseph, J., Ganjam, V. K., Weber, K. T., Extra-adrenal mineralocorticoids and cardiovascular tissue. *J Mol Cell Cardiol*, 1999. 31: p. 1175-84.
124. Spadaro, J., Cicogna, A. C., Tucci, P. J., Cury, P. R., Montenegro, M. R., Morphometric evaluation of the time course of right ventricular hypertrophy after left coronary artery ligation in rats. *Braz J Med Biol Res*, 1989. 22: p. 517-22.
125. Stegemann, H., Stalder, K., Determination of hydroxyproline. *Clin Chim Acta*, 1967. 18: p. 267-73.
126. Struthers, A. D., Pathophysiology of heart failure following myocardial infarction. *Heart*, 2005. 91 Suppl 2: p. ii14-6; discussion ii31, ii43-8.
127. Sun, Y., Weber, K. T., Fibrosis and myocardial ACE: possible substrate and independence from circulating angiotensin II. *J Card Fail*, 1994. 1: p. 81-9.
128. Sun, Y., Weber, K. T., Infarct scar: a dynamic tissue. *Cardiovasc Res*, 2000. 46: p. 250-6.
129. Sun, Y., Zhang, J. Q., Zhang, J., Lamparter, S., Cardiac remodeling by fibrous tissue after infarction in rats. *J Lab Clin Med*, 2000. 135: p. 316-23.

130. Sutton, M. G., Sharpe, N., Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation*, 2000. 101: p. 2981-8.
131. Suzuki, T., Higgins, P. J., Crawford, D. R., Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques*, 2000. 29: p. 332-7.
132. Swedberg, K., Eneroth, P., Kjekshus, J., Wilhelmsen, L., Hormones regulating cardiovascular function in patients with severe congestive heart failure and their relation to mortality. CONSENSUS Trial Study Group. *Circulation*, 1990. 82: p. 1730-6.
133. Swedberg, K., Held, P., Kjekshus, J., Rasmussen, K., Ryden, L., Wedel, H., Effects of the early administration of enalapril on mortality in patients with acute myocardial infarction. Results of the Cooperative New Scandinavian Enalapril Survival Study II (CONSENSUS II). *N Engl J Med*, 1992. 327: p. 678-84.
134. Swedberg, K., Cleland, J., Dargie, H., Drexler, H., Follath, F., Komajda, M., Tavazzi, L., Smiseth, O. A., Gavazzi, A., Haverich, A., Hoes, A., Jaarsma, T., Korewicki, J., Levy, S., Linde, C., Lopez-Sendon, J. L., Nieminen, M. S., Pierard, L., Remme, W. J., Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005): The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*, 2005. 26: p. 1115-40.
135. Takeda, Y., Yoneda, T., Demura, M., Miyamori, I., Mabuchi, H., Cardiac aldosterone production in genetically hypertensive rats. *Hypertension*, 2000. 36: p. 495-500.
136. Tillmann, H. C., Schumacher, B., Yasenyev, O., Junker, M., Christ, M., Feuring, M., Wehling, M., Acute effects of aldosterone on intracardiac monophasic action potentials. *Int J Cardiol*, 2002. 84: p. 33-9; discussion 39-40.
137. Ullian, M. E., Schelling, J. R., Linas, S. L., Aldosterone enhances angiotensin II receptor binding and inositol phosphate responses. *Hypertension*, 1992. 20: p. 67-73.
138. Urata, H., Nishimura, H., Ganten, D., Arakawa, K., Angiotensin-converting enzyme-independent pathways of angiotensin II formation in human tissues and cardiovascular diseases. *Blood Press Suppl*, 1996. 2: p. 22-8.

139. Wall, S. J., Edwards, D. R., Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR): a comparison of primer-dropping, competitive, and real-time RT-PCRs. *Anal Biochem*, 2002. 300: p. 269-73.
140. Weber, K. T., Pick, R., Janicki, J. S., Gadodia, G., Lakier, J. B., Inadequate collagen tethers in dilated cardiopathy. *Am Heart J*, 1988. 116: p. 1641-6.
141. Weber, K. T., Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J Am Coll Cardiol*, 1989. 13: p. 1637-52.
142. Weber, K. T., Sun, Y., Campbell, S. E., Structural remodelling of the heart by fibrous tissue: role of circulating hormones and locally produced peptides. *Eur Heart J*, 1995. 16 Suppl N: p. 12-8.
143. Weber, K. T., Extracellular matrix remodeling in heart failure: a role for de novo angiotensin II generation. *Circulation*, 1997. 96: p. 4065-82.
144. Weber, K. T., Aldosterone in congestive heart failure. *N Engl J Med*, 2001. 345: p. 1689-97.
145. White, P. C., Aldosterone: direct effects on and production by the heart. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003. 88: p. 2376-83.
146. Whittaker, P., Boughner, D. R., Kloner, R. A., Role of collagen in acute myocardial infarct expansion. *Circulation*, 1991. 84: p. 2123-34.
147. Witherow, F. N., Helmy, A., Webb, D. J., Fox, K. A., Newby, D. E., Bradykinin contributes to the vasodilator effects of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition in patients with heart failure. *Circulation*, 2001. 104: p. 2177-81.
148. Woodiwiss, A. J., Tsotetsi, O. J., Sprott, S., Lancaster, E. J., Mela, T., Chung, E. S., Meyer, T. E., Norton, G. R., Reduction in myocardial collagen cross-linking parallels left ventricular dilatation in rat models of systolic chamber dysfunction. *Circulation*, 2001. 103: p. 155-60.
149. Yamamoto, K., Masuyama, T., Sakata, Y., Doi, R., Ono, K., Mano, T., Kondo, H., Kuzuya, T., Miwa, T., Hori, M., Local neurohumoral regulation in the transition to isolated diastolic heart failure in hypertensive heart disease: absence of AT1 receptor downregulation and 'overdrive' of the endothelin system. *Cardiovasc Res*, 2000. 46: p. 421-32.

150. Yoshida, K., Kim-Mitsuyama, S., Wake, R., Izumiya, Y., Izumi, Y., Yukimura, T., Ueda, M., Yoshiyama, M., Iwao, H., Excess aldosterone under normal salt diet induces cardiac hypertrophy and infiltration via oxidative stress. *Hypertens Res*, 2005. 28: p. 447-55.
151. Yoshimura, M., Nakamura, S., Ito, T., Nakayama, M., Harada, E., Mizuno, Y., Sakamoto, T., Yamamuro, M., Saito, Y., Nakao, K., Yasue, H., Ogawa, H., Expression of aldosterone synthase gene in failing human heart: quantitative analysis using modified real-time polymerase chain reaction. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. 87: p. 3936-40.
152. Young, M., Funder, J., Mineralocorticoid action and sodium-hydrogen exchange: studies in experimental cardiac fibrosis. *Endocrinology*, 2003. 144: p. 3848-51.
153. Young, M. J., Clyne, C. D., Cole, T. J., Funder, J. W., Cardiac steroidogenesis in the normal and failing heart. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001. 86: p. 5121-6.
154. Zak, R., Cell proliferation during cardiac growth. *Am J Cardiol*, 1973. 31: p. 211-9.
155. Zannad, F., Alla, F., Dousset, B., Perez, A., Pitt, B., Limitation of excessive extracellular matrix turnover may contribute to survival benefit of spironolactone therapy in patients with congestive heart failure: insights from the randomized aldactone evaluation study (RALES). Rales Investigators. *Circulation*, 2000. 102: p. 2700-6.
156. Zannad, F., Dousset, B., Alla, F., Treatment of congestive heart failure: interfering the aldosterone-cardiac extracellular matrix relationship. *Hypertension*, 2001. 38: p. 1227-32.
157. Zhang, Z. H., Francis, J., Weiss, R. M., Felder, R. B., The renin-angiotensin-aldosterone system excites hypothalamic paraventricular nucleus neurons in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002. 283: p. H423-33
158. Effect of ramipril on mortality and morbidity of survivors of acute myocardial infarction with clinical evidence of heart failure. The Acute Infarction Ramipril Efficacy (AIRE) Study Investigators. *Lancet*, 1993. 342: p. 821-8.

DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich Herrn Privatdozent Dr. med. J. Bauersachs für die freundliche Überlassung des Themas danken.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Frau Dr. rer. nat. D. Fraccarollo, Herrn Dr. rer. nat. P. Galuppo und Herrn Privatdozent Dr. med. J. Bauersachs für die exzellente Anleitung, Hilfestellung und Betreuung.

Danke sagen möchte ich auch allen Mitarbeitern und Kollegen des kardiologischen Labors, insbesondere Frau M. Leutke, Herrn Dr. med. J. Widder, Herrn Dr. med. A. Schäfer sowie Herrn cand. med. M. Hoffmann und Frau J. Pfrang.

Ein weiterer Dank geht an Herrn Privatdozent Dr. med. J. Bauersachs, Frau Dr. rer. nat. D. Fraccarollo, Herrn Dr. rer. nat. P. Galuppo sowie meine Familie für die konstruktive Kritik und die mühselige Aufgabe des Korrekturlesens.

Besonderer Dank gilt weiterhin meiner Familie und insbesondere meinem verstorbenen Vater für die unermüdliche Unterstützung und Motivation. Danken möchte ich neben meiner Familie auch meinen Freunden, die teilweise viel Geduld und Nachsicht aufbringen mussten.