

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. Georg Ertl**

**Verbesserung der Infarktheilung durch sofortige selektive  
Mineralkortikoidrezeptor-Blockade nach Myokardinfarkt**

**Inaugural - Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Carolin Hauck**

**aus Würzburg**

**Würzburg, November 2008**

**Referent:** Prof. Dr. Johann Bauersachs

**Koreferent:** Prof. Dr. Kai Schuh

**Dekan:** Prof. Dr. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 29.09.2009

**Die Promovendin ist Ärztin.**

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>.....</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
Epidemiologie der Herzinsuffizienz.....	1
Neurohumorale Aktivierung und ventrikuläres Remodeling nach Myokardinfarkt.....	2
Aldosteron – Synthese, Wirkungen und Mineralkortikoid-Antagonismus.....	12
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>21</b>
2.1 Studienprotokoll und Myokardinfarkt.....	21
2.1.1 Versuchstiere.....	21
2.1.2 Myokardinfarzierung.....	21
2.1.3 Einteilung in die Versuchsgruppen und Medikation.....	22
2.2 Behandlung mit liposomumkapseltem Clodronat.....	23
2.3 Hämodynamik und linksventrikuläre Volumenmessungen.....	23
2.4 Infarktgrößenbestimmung und Expansionsindex.....	24
2.5 Leukozyten, Aldosteron und Corticosteron.....	25
2.6 Immunhistochemie.....	26
2.7 Biochemische Studie.....	26
2.7.1 Gewebeprobenentnahme.....	26
2.7.2 Probenaufbereitung für die Proteinanalyse.....	27
2.7.3 Genexpressionsanalyse mittels Mikroarray.....	28
2.7.4 Western Blot.....	31
2.7.5 Zytokine.....	32
2.7.6 Zymographie und reverse Zymographie.....	33
2.7.7 Hydroxyprolinbestimmung.....	34
2.8 Statistische Auswertung.....	34
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>36</b>
3.1 Globale Parameter.....	36
3.2 Infarktgrößen.....	37
3.3 Ventrikelmorphologie.....	38
3.4 Hämodynamik.....	40
3.4.1 Linksventrikulärer systolischer Druck (LVSP) .....	40
3.4.2 Linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP) .....	40
3.4.3 Rechter Vorhofdruck (RAP) .....	41
3.4.4 Maximale linksventrikuläre Druckanstiegs- bzw. Druckabfalls- Geschwindigkeit (LV $dp/dt_{max}$ bzw. LV $dp/dt_{min}$ ) .....	42
3.4.5 Druck-Volumen-Kurven.....	43
3.4.6 Linksventrikuläres endsystolisches Volumen (LVESV).....	44

3.4.7 Linksventrikuläres enddiastolisches Volumen (LVEDV).....	44
3.4.8 Linksventrikuläre Ejektionsfraktion.....	45
3.5 Faktor XIIIa-Expression im Infarktgebiet.....	46
3.6 Monozyten/Makrophagen-Infiltration nach Myokardinfarkt.....	51
3.7 Aldosteron- und Corticosteronspiegel im Plasma.....	55
3.8 Proteinexpression im Infarktgebiet.....	57
3.9 Neovaskularisation im linken Ventrikel.....	59
3.10 Linksventrikuläres Kollagen.....	61
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>65</b>
4.1 Tiermodell der Herzinsuffizienz.....	65
4.2 Infarktexpansion, linksventrikuläre Dilatation und Funktion.....	66
4.3 Hämodynamik.....	67
4.4 Monozyten/Makrophagen-Aktivität und Plasmacorticosteron.....	68
4.5 Zytokin- und Faktor XIIIa-Expression im Infarktgebiet.....	70
4.6 Neovaskularisation im linken Ventrikel.....	72
4.7 Kollagenumsatz in der Narbe.....	72
4.8 Klinische Studien.....	75
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>81</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>83</b>
<b>Danksagung.....</b>	
<b>Lebenslauf.....</b>	

## Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-Konversions-Enzym
ACTH	Adrenocorticotropin
ANP	atrial natriuretic peptide
AT <sub>1</sub> -Antagonisten	Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1-Antagonisten
BNP	brain natriuretic peptide
C5a	Komplementfaktor 5a
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CD	Cluster of differentiation
cDNA	komplementäre DNA
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
cRNA	komplementäre RNA
Clodr-lip	liposomumkapseltes Clodronat
CONSENSUS	Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study
COX	Cyclooxygenase
CYP	Cytochrom P
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dP/dt <sub>max</sub>	maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit
dP/dt <sub>min</sub>	maximale Druckabfallsgeschwindigkeit
4E-Studie	Eplerenon, Enalapril und Eplerenon/Enalapril-Kombination
ECL	Enzymatic Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPHESUS	Eplerenone Post acute myocardial infarction Heart failure Efficacy and SURvival Study
EPLE	Eplerenon
ET <sub>A</sub>	Endothelinrezeptor Subtyp A
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
HCl	Chlorwasserstoff
HRP	Horseradish peroxidase
HSD	Hydroxysteroid Dehydrogenase
11β-HSD2	11β-Hydroxysteroid Dehydrogenase-2
IL	Interleukin
K+	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
KG	Körpergewicht
LOX	Lipoxygenase
LV	linker Ventrikel
LVEDP	linksventrikulärer enddiastolischer Druck
LVEDV	linksventrikuläres enddiastolisches Volumen
LVESV	linksventrikuläres endsystolisches Volumen
LVSP	linksventrikulärer systolischer Druck
MCP	Monocyte chemoattractant protein

## Abkürzungsverzeichnis

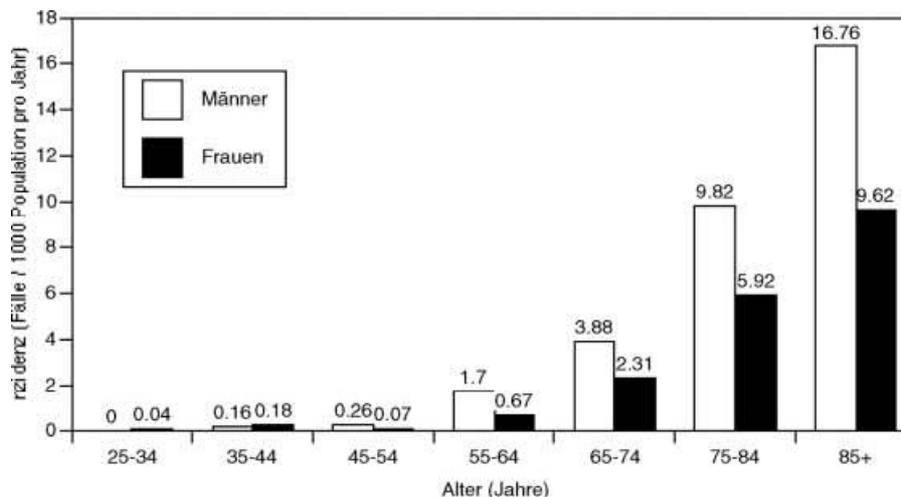
---

MC2R	Melanocortinrezeptor 2
MHC	schwere Kette des Myosins
MI	Myokardinfarkt
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MR	Mineralkortikoidrezeptor
mRNA	Botenstoff-Ribonukleinsäure
Na <sup>+</sup>	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (reduzierte Form)
NaF	Natriumfluorid
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
NO	Stickstoffmonoxid
NYHA	New York Heart Association
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1
PLA	Placebo
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RALES	Randomized ALdactone Evaluation Study
RAP	rechter Vorhofdruck
RESOLVD	Randomized Evaluation of Strategies for Left Ventricular Dysfunction
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
RIVA	Ramus interventricularis anterior
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive Oxygen Species
SAVE	Survival and Ventricular Enlargement Study
SOLVE	Studies of Left Ventricular Dysfunction
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	Standardfehler (Standard Error of the Mean)
sgk-1	Serum- und Glukokortikoid-induzierbaren Kinase-1
TBST	Tris-buffered Saline Tween
TGF- $\beta$	Tumorwachstumsfaktor- $\beta$
TIMP	tissue inhibitor of matrixmetalloproteinase
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
V <sub>p</sub>	Parallel-Volumen
ZnCl <sub>2</sub>	Zinkchlorid

## 1. Einleitung

### Epidemiologie der Herzinsuffizienz

In den westlichen Industrieländern ist die chronische Herzinsuffizienz eine der häufigsten kardialen Erkrankungen. Die **Hillingdon-Studie** (29) erbrachte eine Inzidenz von 0.13% pro Jahr, mit einem Anstieg von 0.002% bei 25- bis 34jährigen auf 1.16% bei über 85jährigen. Das mittlere Alter bei Diagnosestellung betrug 76 Jahre (Abbildung 1).



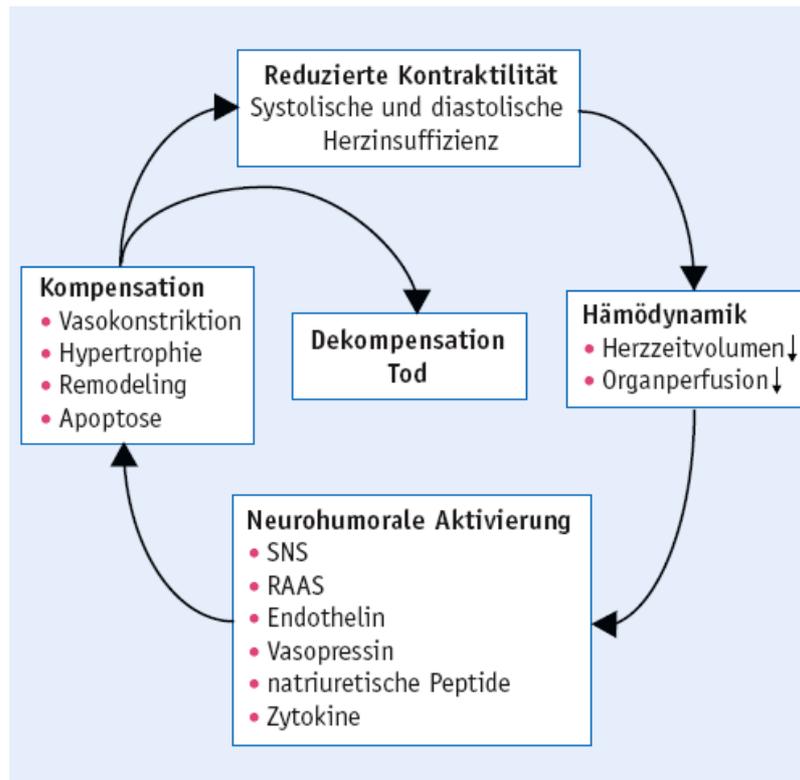
**Abbildung 1:** *Inzidenz der Herzinsuffizienz* nach Alter und Geschlecht in der Hillingdon-Studie (29).

Daten der **Framingham-Studie** (84) belegen, dass die Erkrankung bei 30% der Männer und Frauen mit Herzinfarkt auftritt. Wesentliche ätiologische Faktoren, die zu einer Herzinsuffizienz führen, sind laut Studie an erster Stelle die Hypertonie (49%), gefolgt von der koronaren Herzkrankheit (29%), Diabetes mellitus (9%), Herzklappen-

erkrankungen (8%) und linksventrikulärer Hypertrophie (5%). Interessanterweise kam es über die zweite Hälfte des 20. Jahrhunderts zu einer beachtlichen Häufigkeitszunahme der koronaren Herzkrankheit und des Diabetes als ursächliche Faktoren der Herzinsuffizienz, wohingegen die Bedeutung von arterieller Hypertension und rheumatischen Herzklappenerkrankungen zurückgegangen ist (5). Obwohl sich in den letzten Jahrzehnten das Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen, die der Krankheitsentstehung zugrunde liegen, enorm verbessert hat und neue erfolgreiche Behandlungsstrategien entwickelt wurden, bleibt die Mortalitätsrate außerordentlich hoch. Bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz liegt die 5-Jahres-Überlebensrate trotz aller Therapiemaßnahmen unter 50% (83). Schätzungen gehen von einer 1-Jahres-Mortalität der NYHA-Klassen II, III und IV von 10%, 20%, bzw. 40% aus (57). Somit ist die Prognose ausgesprochen ungünstig und nicht besser als bei vielen malignen Erkrankungen. Aufgrund der immer älter werdenden Bevölkerung und der verbesserten Überlebenschancen nach einem Herzinfarkt wird die Prävalenz der Herzinsuffizienz weiter ansteigen. Darüber hinaus verursacht die Erkrankung eine erhebliche ökonomische Belastung, indem in westlichen Ländern 1-2% des gesamten Gesundheitsbudgets für die Behandlung aufgewendet werden müssen (95). Es wird demnach auch weiterhin Gegenstand intensiver Forschung sein, noch effektivere Therapiemethoden zu entwickeln, um das Überleben bei Herzinsuffizienz-Patienten zu verbessern.

### **Neurohumorale Aktivierung und ventrikuläres Remodeling nach Myokardinfarkt**

In Folge eines Myokardinfarktes kommt es zu Anpassungsvorgängen des Herzkreislaufsystems auf die kardiale Dysfunktion, der neurohumoralen Aktivierung und dem kardialen Remodeling. Diese Mechanismen erlauben kurzfristig eine Stabilisierung der Myokardfunktion und damit der Perfusion lebenswichtiger Organe. Bei chronischer Aktivierung tragen dieselben Mechanismen jedoch wesentlich zur Progression der Herzinsuffizienz bei, es entsteht ein Circulus vitiosus (Abbildung 2) (166).



**Abbildung 2: Circulus vitiosus der chronischen Herzinsuffizienz** (SNS=sympathisches Nervensystem; RAAS=Renin-Angiotensin-Aldosteron-System) (166).

Der kardiale Heilungsprozess nach Infarkt schließt eine entzündliche Zellinfiltration, die Freisetzung neurohumoraler Mediatoren, den extrazellulären Matrixumbau und reaktive Antworten kardialer Myozyten mit ein (40,46,75,91,158). Durch die Ischämie werden mehrere Wege eingeleitet, die zu einer Ausdünnung und Dilatation der infarzierten Myokardwand führen können. Dies resultiert in einer Aneurysmabildung, linksventrikulären Dysfunktion, in lebensbedrohenden Arrhythmien und einer Herzinsuffizienz. Therapeutische Ansätze, die auf pathophysiologische Mechanismen und Vermittler einer frühen kardialen Heilung und Reparatur zielen, scheinen ein nützliches Werkzeug zu sein, um chronische Komplikationen zu verhindern (40,46,75,91,158).

In den ersten Stunden nach Infarkt kommt es zur Myozytennekrose und einer Entzündungsreaktion mit Ödembildung in der Infarktregion. Es schließt sich eine Phase der Re-Organisation des nekrotischen Gewebes mit Fibroblastenproliferation und Kollagenbildung an, die zur Entstehung der Infarktnarbe führt (109). Die Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen kann unter anderem zu einer Ausdehnung der Infarktregion mit begleitender Ausdünnung der Ventrikelwand führen. Dieser Vorgang führt mitunter zur Infarktexpansion (30). Durch den Verlust an kontraktilen Gewebe wird das vitale Restmyokard volumenbelastet. Die mechanische Mehrbeanspruchung des Herzmuskels führt im Verlauf zu einer kompensatorischen Hypertrophie und sekundären Dilatation. Die Gesamtheit der Umbauprozesse, die Veränderungen der Ventrikelgröße, -form und -funktion nach sich ziehen, wird als ventrikuläres Remodeling bezeichnet (18,150). Obwohl es zunächst eine adaptive Antwort ist, die normale kardiale Funktion aufrechtzuerhalten, führt das Remodeling schließlich zu einer fortschreitenden Dekompensation und dem Syndrom der Herzinsuffizienz. Diese ist durch den Symptomenkomplex der Leistungsminderung, Dyspnoe und der Neigung zu Ödemen gekennzeichnet.

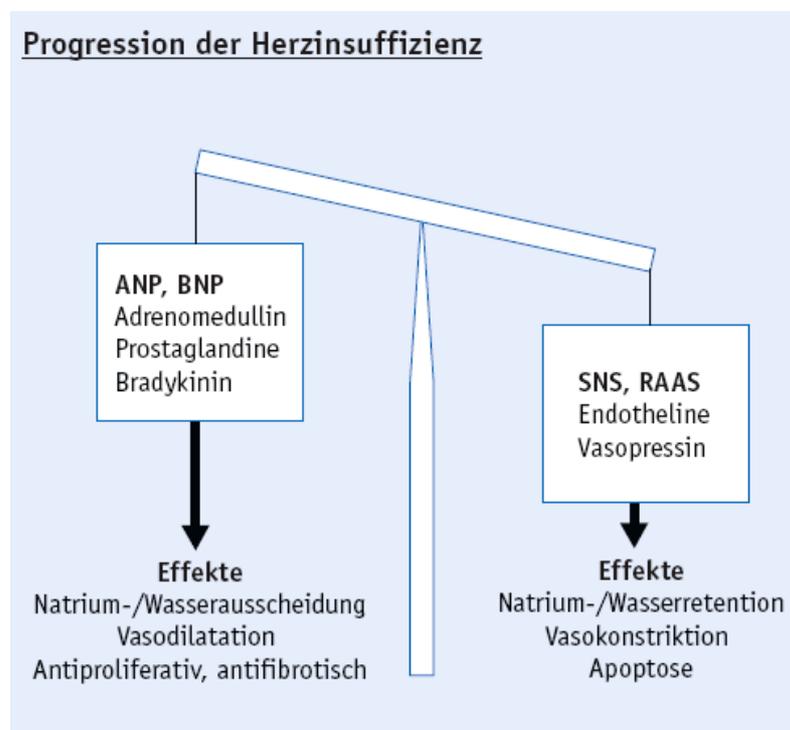
Das kardiale Remodeling tritt unter mehreren pathologischen Umständen in Erscheinung, wie etwa bei Herzinfarkt, Kardiomyopathie, Hypertonie und Herzklappenerkrankungen (150) und manifestiert sich in molekularen, zellulären und interstitiellen Veränderungen des Herzens. Neurohumorale, hämodynamische und genetische Faktoren regulieren den Myozytenverlust, die Hypertrophie, eine Ventrikeldilatation und die interstitielle Fibrosierung. Der strukturelle linksventrikuläre Umbau nach Myokardinfarkt ist ein dynamischer zeitabhängiger Prozess, der die Infarktregion und das verbleibende lebensfähige Myokard einschließt. Die Ausweitung der Herzkammer in der frühen Postinfarktphase ist eine Konsequenz der Ausdünnung und Dilatation der Infarktzone, die unaufhaltsam fortschreitet und nach sieben Tagen bei Ratten einen Höchstwert erreicht (66). In der späten Remodelingphase resultiert die ventrikuläre Erweiterung aus architektonischen Umbauvorgängen des überlebenden Myokards. Diese schließen eine Myozytenhypertrophie, eine Dilatation und eine reaktive Fibrosierung mit ein (150). Eine vermehrte Kollagenbildung abseits des Infarktgebietes führt zu einer erhöhten myokardialen Steifigkeit und kontraktilen

Dysfunktion und trägt zu einer fortschreitenden Ventrikelausweitung und zur Herzinsuffizienz bei (12,165). Die Anpassungsvorgänge nach Myokardinfarkt können in eine frühe und eine späte Heilungsphase eingeteilt werden. Die Inflammation ist ein Ereignis der ersten Stunden nach Myokardinfarkt, die zu einer Infarktextension führt. Im ischämischen Areal kommt es dabei zur Nekrose und Apoptose der Kardiomyozyten, zur Induktion inflammatorischer Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) und zur Einwanderung inflammatorischer Zellen. Nekrotische Zelltrümmer werden eliminiert und eine lokalisierte Angiogenese in Gang gesetzt (40). Bei der frühen Phase handelt es sich um einen akuten Prozess, der Tage bis Wochen andauert. Sie spielt sich vorwiegend in der Infarktzone und der Periinfarktregion ab und beinhaltet den Mechanismus der Infarktexpansion, der zu einer Aneurysmabildung oder Ventrikelruptur führen kann (7,40). Faktoren wie Infarktlokalisierung, Infarktgröße, Dicke des infarzierten Myokards und Füllungsbedingungen des linken Ventrikels tragen zur Wahrscheinlichkeit und der Bedeutung einer Infarktexpansion bei. Sie tritt bei bis zu 50% der Vorderwandinfarkte auf und steht in deutlicher Beziehung zu einer schlechteren Prognose (168). Diese frühe Heilungsphase beinhaltet ebenso die reparative Fibrose. Dazu gehört eine erhöhte Zahl an Fibroblasten, Kapillaren und eine verstärkte Kollagendisposition (40). Die späte Heilungsphase findet Wochen bis Monate nach Myokardinfarkt statt und wird als kardiales Remodeling bezeichnet, das einen chronischen Anpassungsprozess darstellt. Im ischämischen Areal führt es zur Narbenbildung und linksventrikulären Dilatation. Im überlebenden Myokard spielen reaktive Fibrose und Hypertrophie die entscheidende Rolle (40). Diese Phase besteht aus Veränderungen in Gestalt und Größe des linken Ventrikels. Obwohl Kardiomyozyten eine entscheidende Rolle im Remodelingprozess spielen, sind Fibroblasten, Koronargefäße und die Extrazellulärmatrix ebenso beteiligt (28,90). Der Remodelingprozess ist mit einer beachtlichen Zunahme der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität assoziiert (98,145,169). Die **SAVE-Studie** (Survival and Ventricular Enlargement) und die **SOLVE**-Untersuchungen (Studies of Left Ventricular Dysfunction) haben eindeutig demonstriert, dass eine kardiale Vergrößerung bzw. eine fortschreitende ventrikuläre Dilatation unabhängig voneinander mit ungünstigen kardiovaskulären Ergebnissen verbunden sind, einschließlich einer Herzinsuffizienz (145,169).

## 1. Einleitung

---

Infolge der linksventrikulären Funktionseinschränkung werden nach Myokardinfarkt neurohumorale Mechanismen in Gang gesetzt, die dem Erhalt einer suffizienten Gewebepfusion dienen. Therapeutisch von Bedeutung sind die sympathoadrenerge Aktivierung und das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS). Daneben spielen aber auch Endothelin, Vasopressin, Zytokine und andere Faktoren eine Rolle (18). Ein Ungleichgewicht zwischen verschiedenen aktivierten neurohumoralen Systemen führt zu einer Progression der Herzinsuffizienz (Abbildung 3) (166).

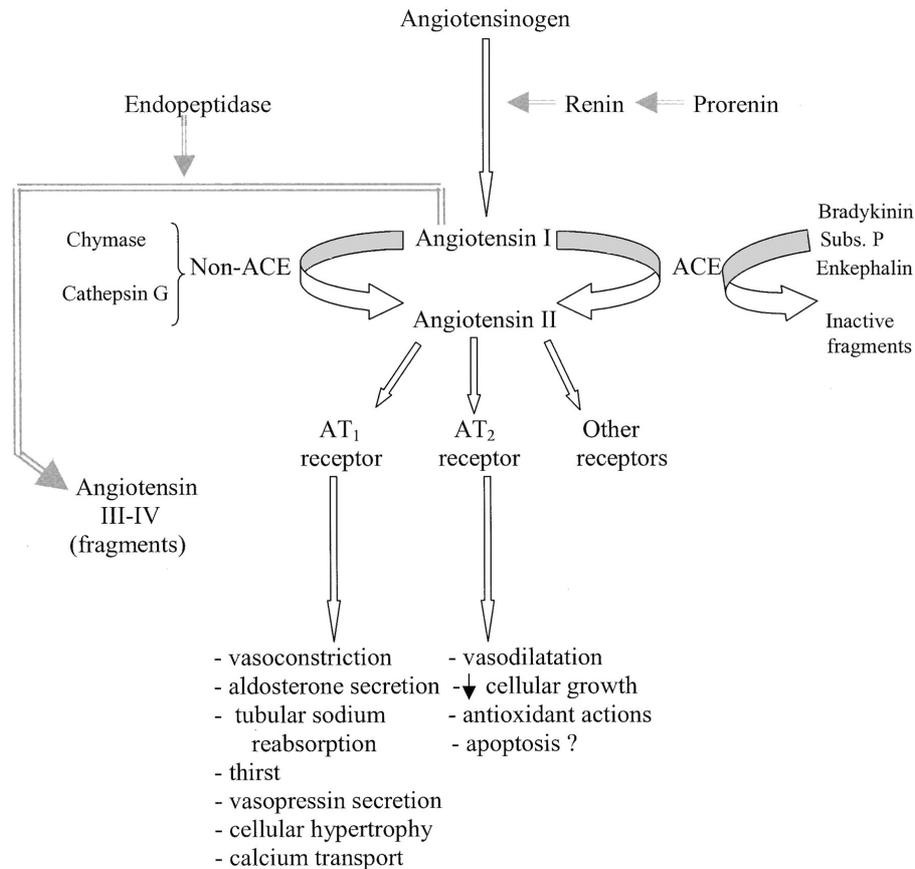


**Abbildung 3:** *Ungleichgewicht zwischen verschiedenen aktivierten neurohumoralen Systemen* als Ursache für die Progression der Herzinsuffizienz (ANP, BNP=natriuretische Peptide; SNS=sympathisches Nervensystem; RAAS=Renin-Angiotensin-Aldosteron-System) (166).

Das sympathische Nervensystem ist bei Herzinsuffizienz sehr früh aktiviert. Es stellt anfangs einen vorteilhaften Kompensationsmechanismus dar, um die kardiale Funktion aufrechtzuerhalten. Eine andauernde Aktivierung hat jedoch deletäre Konsequenzen zur Folge, wie eine Flüssigkeits- und Salzretention, eine Erhöhung der Vor- und Nachlast

sowie einen erhöhten myokardialen Sauerstoffbedarf (71). Erhöhte zirkulierende Katecholamine führen zu systemischer und renaler Vasokonstriktion, positiv inotroper und chronotroper Wirkung, gesteigerter Natrium-Reabsorption in der Niere und einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems mit Anstieg von Renin, Angiotensin II und Aldosteron. Sie können aber auch direkt durch Induktion von Nekrose und Apoptose kardiotoxisch wirken (89). Bei andauernder Katecholamin-ausschüttung kommt es jedoch zu einer Downregulation der  $\beta$ -Rezeptoren mit anschließendem Funktionsverlust (161). So sind hohe Noradrenalinspiegel mit einer schlechteren Prognose der Herzinsuffizienz assoziiert (71). Eine Blockade der  $\beta$ -Rezeptoren führt jedoch zu einer geringeren Aktivierung des RAAS und kann ein negatives Remodeling am Herzen verhindern (1,56), wohingegen eine Überexpression der  $\beta_1$ -Rezeptoren eine verminderte linksventrikuläre Ejektionsfraktion hervorruft.

Das RAAS spielt beim kardialen Remodeling eine wichtige Rolle. Es kann durch Elektrolytverschiebungen, Wandstress, sowie Druck- und Volumenbelastungen des Herz-Kreislaufsystems aktiviert werden (1). Viele Faktoren des RAAS, wie Angiotensinogen, ACE und Angiotensin II Typ1-Rezeptoren (AT1-Rezeptoren) werden nach Myokardinfarkt hochreguliert. Angiotensin II veranlasst eine Hypertrophie der kardialen Myozyten und eine Zunahme der Fibroblastenproliferation sowie der Kollagensynthese. Die meisten physiologischen Effekte werden durch AT1-Rezeptoren vermittelt. Angiotensin II bewirkt schließlich an der Nebennierenrinde eine vermehrte Aldosteronfreisetzung, das eine wichtige Rolle in der  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  Homöostase und in der Entstehung einer myokardialen Fibrose spielt (33). ACE-Hemmer und AT1-Rezeptorantagonisten führen zu einer Abschwächung der Angiotensin II-Wirkungen, können die negativen Effekte von Aldosteron aber nicht vollständig verhindern. Selbst bei einer kompletten Hemmung des RAAS finden sich bei Herzinsuffizienz trotzdem noch erhöhte Aldosteronspiegel, was den Nutzen einer zusätzlichen Blockade des Mineralkortikoids verdeutlicht (94). Eine schematische Darstellung des RAAS und dessen Wirkungen zeigt Abbildung 4.



**Abbildung 4:** *Enzymatische Proteinkaskade des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems*, seinen Komponenten und Funktionen. Nach Volpe (164).

Endothelin-1 ist ebenso am Remodelingprozess beteiligt, indem der potente Vasokonstriktor zur Kollagensynthese und kardialen Hypertrophie, ebenso wie der Tumorstromungsfaktor TGF- $\beta$ 1, beiträgt. Plasmaspiegel und die Endothelin-1 Konzentration im linken Ventrikel sind bei chronischer Herzinsuffizienz erhöht. Die Gabe nichtselektiver oder ET<sub>A</sub>-selektiver Antagonisten zeigt günstige Auswirkungen auf die kardiale Funktion und das Remodeling bei Menschen und Tiermodellen mit Herzinsuffizienz (38). Norepinephrin führt zu einer erhöhten Nachlast durch systemische Vasokonstriktion und trägt zur Myozytenschädigung bei. Schließlich ist, vermittelt über Barorezeptoren, auch die Freisetzung von Vasopressin bei Herzinsuffizienz erhöht und trägt zu Flüssigkeitsretention und peripherer Widerstands-

erhöhung bei (108). Diese endogenen vasokonstriktorisches und flüssigkeits-retinierenden Systeme werden unter physiologischen Bedingungen durch antagonistische Systeme über komplexe Interaktionen in einem Gleichgewicht gehalten. Aus der Gruppe der natriuretischen Peptide scheinen vor allem das Atrial Natriuretic Peptid (ANP) und das Brain Natriuretic Peptid (BNP) bei Herzinsuffizienz eine Rolle zu spielen. ANP wird primär aus den Vorhöfen, BNP aus den Ventrikeln bei Vorhofdehnung bzw. erhöhtem Füllungsdruck freigesetzt. Sie bewirken eine Vasodilatation, erhöhen die renale Natrium-Ausscheidung und haben antiproliferative Effekte am Myokard (108). Die chronische Herzinsuffizienz geht mit endothelialer Dysfunktion und verminderter endothelvermittelter Vasodilatation einher, welche zumindest teilweise durch verminderte Synthese und Freisetzung, als auch durch erhöhte Deaktivierung von Stickstoffmonoxid (NO) zu erklären ist. Im Gegensatz dazu scheint die NO-Synthese in Myokard und Skelettmuskulatur erhöht zu sein. Am insuffizienten Myokard kann NO konzentrationsabhängig über verschiedene Mechanismen zu Apoptose, zytotoxischen Effekten und Veränderungen der Kontraktilität führen (108). Adrenomedullin ist ein 1993 erstmals beschriebenes Peptid mit potenten vasodilatatorischen und natriuretischen Wirkungen. Es hemmt sowohl das RAAS als auch das Endothelin-System. Neben seiner positiv-inotropen Wirkung supprimiert Adrenomedullin die Aldosteronsynthese und steigert die Herzfrequenz sowie das Herzminutenvolumen. Ob diese Effekte klinisch-therapeutisch umgesetzt werden können, ist derzeit noch unklar (166). Die Plasmaspiegel dieses Peptids sind bei Herzinsuffizienz erhöht, die genaue Rolle in der Pathophysiologie ist wie für andere involvierte Hormonsysteme wie z.B. Prostaglandine noch unklar (108). Auch Zytokine, wie TNF- $\alpha$  und IL-6 sind am kardialen Remodeling beteiligt. Experimentelle Studien haben gezeigt, dass erhöhte TNF- $\alpha$ -Spiegel bei Patienten mit Herzinsuffizienz zu finden sind und zu einer Progression der linksventrikulären Dysfunktion führen (17). Darüber hinaus beeinflusst der Tumornekrosefaktor das Remodeling durch die Induktion myokardialer Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und nachfolgendem Abbau von Komponenten der Extrazellulärmatrix wie fibrilläre Kollagene (Typ I, II und III), Gelatin, Fibronectin und Laminin. Bei Herzinsuffizienz-Patienten konnten erhöhte Spiegel von MMP-2, MMP-3, MMP-9 und MMP-13 im Myokard nachgewiesen werden (17,85).

Ein wichtiger Anpassungsprozess im Rahmen des ventrikulären Remodelings ist die Hypertrophie der Myokardzellen als Antwort auf den Verlust an kontraktilem Gewebe. Sie gleicht die erhöhte Belastung des überlebenden Myokards aus, wirkt einer zunehmenden Dilatation entgegen und verbessert somit die linksventrikuläre Funktion (109). Ein bedeutender Stimulus der Hypertrophie ist die erhöhte Wandspannung. Kardiomyozyten registrieren die mechanische Dehnung und transformieren sie in intrazelluläre Signalwege, die den Hypertrophieprozess herbeiführen (131). Zu den neurohumoralen und para- bzw. autokrin bedeutsamen Mediatoren zählen vor allem Angiotensin II, Noradrenalin, Endothelin-1, TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  (18). Bei einer Drucküberlastung des Herzens kommt es überwiegend zu einer Zunahme des Kardiomyozyten-Querschnitts. Ultrastrukturell findet sich eine Vermehrung der kontraktilem Einheiten, wobei die neu gebildeten Sarkomere parallel geschaltet werden und so zu einer Zunahme des Zellquerschnitts führen. Dieser Vorgang wird als konzentrische Hypertrophie bezeichnet. Auch bei der Volumenüberlastung des Herzens steigt die Wandspannung an, allerdings überwiegend in der Diastole. Die Folge ist eine Zunahme der Kardiomyozyten-Länge, die zu einer Dilatation des linken Ventrikels führt. Neu gebildete Sarkomere werden dabei in Serie angeordnet (166). Die kardiale Volumenbelastung hat demnach eine exzentrische Hypertrophie zur Folge, wie sie auch bei einer ischämischen Herzinsuffizienz zu beobachten ist (12).

Die Ausbildung der kardialen Hypertrophie wird jedoch nicht von allen Zellen vollzogen. Vielmehr sterben bei gesteigerter Wandspannung vereinzelte Kardiomyozyten ab, so dass klinische Beobachtungen für eine Steigerung der Apoptose am insuffizienten Herzen sprechen (103,105). Neben der Zellhypertrophie stimulieren ein aktiviertes RAAS, ein aktivierter Sympathikus und eine Ischämie oder eine Reoxygenierung (52) die Apoptose im Herzen. Diese Mechanismen führen zu einer kardialen Dysfunktion und begünstigen eine weitere Progression des Remodelings.

Charakteristisch für das insuffiziente und hypertrophierte Herz sind darüber hinaus Veränderungen der extrazellulären Matrix (18). Die extrazelluläre Matrixbildung und die resultierende Fibrose hängen vom Gleichgewicht zwischen der Synthese und dem Abbau von Matrixmolekülen wie Kollagen und Proteoglykanen ab. Es kommt sowohl im Infarktbereich als auch im davon entfernten Gewebe zu fibrotischen Ablagerungen.

Dabei verändern sich nicht nur die Kollagenmenge, sondern auch die Verteilung der Kollagenisoformen, die Kollagenarchitektur, sowie die Quervernetzung der fibrillären Fasern. Die Kollagenvermehrung und Fibrosierung führen im infarzierten Myokard zu einer Narbenbildung, die vor einer drohenden Ventrikelruptur schützen soll (149). Im erhaltenen Restmyokard tritt als Folge eine Versteifung des Ventrikels und damit einhergehender Abnahme der Kontraktionsfähigkeit und eine Relaxationsstörung auf (18,165). Selbst auf die Reizleitung hat die Fibrosierung eine Auswirkung, indem sie das Auftreten von ventrikulären Rhythmusstörungen begünstigt (154). Somit stellt sie einen wesentlichen Pathomechanismus im Prozess des kardialen Remodelings dar (12,165). Auch bei den Umbauvorgängen der Extrazellulärmatrix spielt die neurohumorale Aktivierung, insbesondere das RAAS eine zentrale Rolle (22). Im vitalen Myokard außerhalb des Infarktbereichs konnten erhöhte Angiotensin II- bzw. Aldosteronkonzentrationen nachgewiesen werden, die zu einer verstärkten Fibrosierung führten. Zusammen bewirken sie eine erhöhte PAI-1-Expression (Plasminogen activator inhibitor-1) (24), die durch Hemmung der Plasminproduktion und gesteigerter MMP-Sekretion und -Aktivierung (88) eine Fibrose herbeiführt. Ebenso wurde durch eine Untersuchung an kultivierten kardialen Fibroblasten eine Stimulierung der Kollagensynthese durch diese Mediatoren festgestellt (22). Die Gabe eines ACE-Hemmers verhindert die Entstehung einer ventrikulären Hypertrophie, jedoch nicht die myokardiale Fibrose, was zu der Annahme führt, dass die fibrotische Wirkung von Aldosteron unabhängig von Angiotensin II auftritt (20). Durch eine Behandlung mit dem AT1-Rezeptorblocker Losartan und dem Aldosteron-Antagonisten Spironolacton konnte die Kollagenvermehrung deutlich reduziert werden (34,138). So führt ein fibrotischer Umbau der extrazellulären Matrix zu einer systolischen wie auch diastolischen Dysfunktion, und ist mit einer Progression der Herzinsuffizienz sowie dem Auftreten eines plötzlichen Herztods assoziiert (34).

Das kardiale Remodeling ist zusammenfassend charakterisiert durch die neurohumorale Aktivierung und eine Imbalanz mit Dominanz der vasokonstriktorisches, anti-natriuretischen über die antagonistischen Systeme und trägt zur Entstehung der Herzinsuffizienz bei. Neben renalen und hämodynamischen Effekten scheinen für die Progression des Syndroms vor allem auch die direkten myokardialen Wirkungen dieser

Systeme von kritischer Bedeutung zu sein. Es handelt es sich also um einen äußerst komplexen Prozess, der hinsichtlich zahlreicher Aspekte noch unvollständig geklärt ist.

### **Aldosteron – Synthese, Wirkungen und Mineralkortikoid-Antagonismus**

Im Jahre 1953 beschrieben *Simpson und Tait* (140) erstmals das adrenale Hormon Aldosteron. Das Mineralkortikoid stellt das letzte endokrine Signal im RAAS dar und spielt eine herausragende Rolle für die Na<sup>+</sup>-Rückresorption, K<sup>+</sup>-Ausscheidung über Epithelzellen und somit in der Aufrechterhaltung des Flüssigkeitsgleichgewichts und der Blutdruckhomöostase. Somit kann eine Aldosteronüberproduktion zu einem arteriellen Hypertonus und schließlich auch zu unerwünschten Effekten auf das kardiovaskuläre System führen. Lange Zeit wurden in der pathophysiologischen Rolle von Aldosteron hauptsächlich Effekte gesehen, die zu einer Volumenexpansion und Blutdruckerhöhung führen. Heute wird auch die Hypothese einer direkten Aldosteronwirkung auf das kardiovaskuläre System zahlreich belegt. *Brilla et al.* haben erstmals gezeigt, dass eine Aldosterongabe mit hoher Salzaufnahme Hypertonie und kardiale Hypertrophie mit ventrikulärer Fibrose verursacht (21). In der Pathogenese kardiovaskulärer Krankheiten spielt das Steroidhormon eine wichtige Rolle, unabhängig von Angiotensin II. So haben beispielsweise Patienten mit einem primären Hyperaldosteronismus, bei denen Angiotensin-Spiegel normalerweise sehr niedrig sind, eine höhere Inzidenz an linksventrikulärer Hypertrophie und Schlaganfall, als Patienten mit essentieller Hypertonie (155). Aldosteron wird aus der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde sezerniert, stimuliert durch Angiotensin II, Adrenocorticotropin (ACTH) und K<sup>+</sup> (41). Aus Cholesterin entsteht über die Zwischenstufe Pregnenolon das Progesteron. Über zwei Hydroxylierungsschritte wird Corticosteron gebildet, aus dem nach einer sich anschließenden Oxidation, unter Beteiligung der Aldosteronsynthase CYP11B2, Aldosteron entsteht. Zielorgane des Mineralkortikoids sind die Epithelzellen des distalen Kolons und des renalen Nephrons sowie Speichel- und Schweißdrüsen. Das

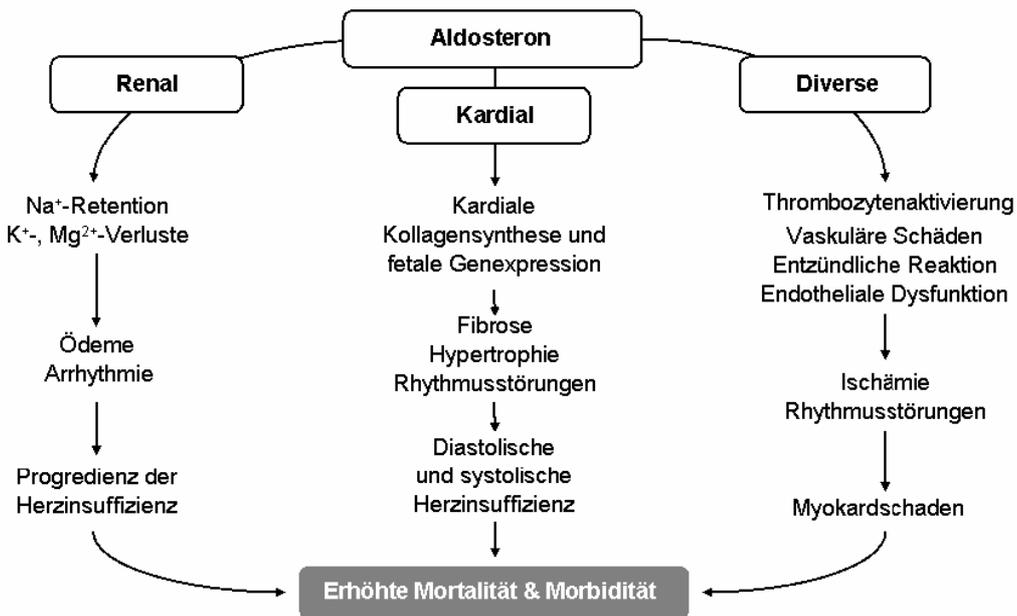
zirkulierende Aldosteron diffundiert über die Plasmamembran und aktiviert durch Bindung zytoplasmatische Mineralkortikoid-Rezeptoren. Im distalen Nephron der Niere führt die Induktion der Serum- und Glukokortikoid-induzierbaren Kinase-1 (sgk-1) zur Absorption von Na<sup>+</sup>-Ionen und Wasser über den epithelialen Natriumkanal sowie zur Kalium-Ausscheidung mit nachfolgender Volumenexpansion und Hypertonie (14). Nach Klonierung von MRs in den späten 1980'ern fand man heraus, dass MRs nicht nur in Epithelzellen vorhanden sind, sondern auch in nichtepithelialen Geweben wie dem Gehirn, Blutgefäßen und dem Herz eine Rolle spielen, was auch aktuelle Studien belegen (6,48). Dort können sie zu kardiovaskulären Krankheiten, wie Hypertonie, Schlaganfall, maligne Nephrosklerose, kardiale Fibrose, ventrikuläre Hypertrophie und myokardiale Nekrose beitragen. Im vaskulären System konnten MRs in Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen nachgewiesen werden (87), wohingegen sie im Herzen in Myozyten, Endothelzellen und Fibroblasten zu finden waren (72,86,87,136,146). MRs binden Mineralkortikoide und Glukokortikoide mit gleicher Affinität. In den Zielgeweben der Mineralkortikoide werden Glukokortikoide (Cortisol und Corticosteron), die potentielle Liganden des MR darstellen und in weitaus höheren Konzentrationen vorhanden sind als Aldosteron, sofort durch 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase-2 (11 $\beta$ -HSD2) in die inaktiven Metabolite Cortison und 11-Dehydrocorticosteron umgewandelt. Dadurch erleichtern sie die Aldosteronbindung an den MR. Unter einer verminderten Enzymaktivität jedoch führt die Bindung der Glukokortikoide an den epithelialen MR zu einer Na<sup>+</sup>-Retention und Hypertonie (170). Mehrere Studien demonstrierten die Koexpression des MR und der 11 $\beta$ -HSD2 im menschlichen Herz, was für spezifische kardiale Aldosteronwirkungen unabhängig von ihren Salz-retinierenden Eigenschaften auf die Niere spricht (72,86,141). Bedeutend ist, dass Glukokortikoide in nichtepithelialen Zellen als Antagonisten des MR fungieren (54). Diese Hypothese wurde bei Mäusen mit einer 11 $\beta$ -HSD2-Überproduktion in Kardiomyozyten bestätigt (119). Diese Tiere entwickelten eine massive kardiale Hypertrophie, Fibrose und eine Herzinsuffizienz, die durch den spezifischen MR-Antagonist Eplerenon abgeschwächt wurde. Darüber hinaus wurde eine Hypertrophie von Kardiomyozyten infolge Aldosteron durch die Zusatzbehandlung mit Corticosteron *in vitro* unterdrückt (132). Durch Aldosteronbindung können über die MRs klassische genomische Wirkungen wie die Stimulierung von Transkription, Translation und

Proteinexpression erzielt werden, die einen Zeitrahmen von mindestens 0.5-1 Stunde in Anspruch nehmen. Darüber hinaus sind jedoch auch schnelle (< 5min), nicht-genomische Wirkungen, z.B. auf das Gefäßsystem beschrieben, die auch teilweise über den klassischen MR vermittelt werden (16,96). Diese lassen sich teilweise durch den selektiven MR-Antagonisten Eplerenon, nicht aber durch das unselektive Spironolacton, hemmen (49).

Neben dem MR werden aber auch Steroidsyntheseenzyme in extra-adrenalen Geweben exprimiert, wie in der Gefäßwand (60,157) und im Myokard (72,130,139), die mit einer de novo Aldosteronproduktion einhergehen können. In der Gefäßwand werden CYP11B1 (11 $\beta$ -Hydroxylase, verantwortlich für den letzten Schritt der Glukokortikoid-synthese) und CYP11B2 (Aldosteronsynthase, katalysiert den Hauptschritt der Aldosteronsynthese) exprimiert (156). Das hierüber synthetisierte Aldosteron verursacht eine endotheliale Dysfunktion und oxidativen Stress, was zu einer abnormalen vasomotorischen Reaktivität und Barorezeptorantwort führt (11,134,135,147). Im Rattenherz wurde die Genexpression von CYP11B2 und CYP11B1, genauso wie eine Produktion von Aldosteron, Corticosteron und deren Vorläufer Deoxycorticosteron nachgewiesen. *Silvestre et al.* konnten zeigen, dass die kardiale Steroidogenese durch Angiotensin II, Adrenocorticotropin, eine niedrige Natrium- und hohe Kaliumzufuhr reguliert wurde (139).

Die Aldosteronproduktion im Herzen (99,138) ebenso wie der Plasmaaldosteronspiegel (42,129,133) ist nach Herzinfarkt und bei chronischer Herzinsuffizienz erhöht. Das Steroidhormon trägt durch eine Begünstigung der Na<sup>+</sup> - und Wasserretention und sympathoadrenergen Aktivierung zu einer endothelialen Dysfunktion, Hypertrophie und vaskulären sowie myokardialen Fibrosierung und damit zu einer Progression des ventrikulären Remodelings bei. Aldosteron führt ebenso zu einer renalen Dysfunktion. Klinische Studien haben eine Beziehung zwischen erhöhten Aldosteronspiegeln und renaler Schädigung nachgewiesen (64). Die Aldosteron/Salz-induzierte Hypertonie wurde als renales Krankheitsmodell verwendet. Der in diesem Modell entstandene Nierenschaden ist histopathologisch durch eine schwere glomeruläre Beschädigung mit vaskulärer Nekrose und thrombotischer Mikroangiopathie charakterisiert, die zu einer renalen Fibrosierung führt (126). Ein MR-Antagonismus verminderte die Proteinurie und Nephrosklerose in spontan hypertensiven Ratten, unabhängig von Blutdruck-

effekten (125,128). Darüber hinaus trägt Aldosteron noch zu weiteren vielfältigen Effekten am Herzen bei, die unabhängig von den Wirkungen auf den Blutdruck sind. Über Calcineurin-abhängige Signalwege wird eine direkt proapoptotische Wirkung erzielt (53). Das Mineralkortikoid kann ebenso Thrombozyten aktivieren, die Fibronectin-Synthese erhöhen, oxidativen Stress verursachen und eine vaskuläre Entzündungsreaktion durch Monozyten- und Makrophageninfiltration sowie eine gesteigerte Expression der inflammatorischen Marker COX-2, Osteopontin, MCP-1 und des intrazellulären Adhäsionsmoleküls-1 hervorrufen (137). Infolge der endothelialen Dysfunktion kommt es zu einer Atherosklerose: Aldosteron erhöht die Aktivität der NAD(P)H-Oxidase, die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (121) und vermindert die protektive endotheliale NO-Produktion. Eine Blockade der Mineralkortikoide mit dem selektiven Mineralkortikoid-Antagonisten Eplerenon kann die deletäre Expression des LOX-1 Rezeptors vermindern, der über Adhäsionsmoleküle eine wichtige Rolle in der Genese der Atherosklerose spielt (76). Aldosteron kann weiterhin für Elektrolytverschiebungen verantwortlich sein und intrakardiale Aktionspotentiale verändern sowie durch kardiale Fibrosierung eine inhomogene Reizweiterleitung bewirken und somit die Entstehung maligner Rhythmusstörungen begünstigen (107). Aufgrund dieser deletären Aldosteronwirkungen war auch in der **CONSENSUS-Studie** (Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study) ein hoher Plasmaaldosteronspiegel bei Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz mit einer schlechten Prognose verbunden (153). In Abbildung 5 sind die schädlichen Aldosteronwirkungen in Bezug auf kardiale Mortalität und Morbidität dargestellt.



**Abbildung 5:** *Wirkungen von Aldosteron* in Bezug auf Morbidität und Mortalität. Nach Bauersachs (10).

Der Nutzen einer zusätzlichen Aldosteronblockade nach Myokardinfarkt wird durch zahlreiche klinische und experimentelle Beobachtungen begründet, die eine persistierende, durch MR-Blockade hemmbare, Aldosteronwirkung trotz der Blockade vorgeschalteter Stufen des RAAS nachgewiesen haben. Ebenso wird ein erhöhter Plasmaaldosteronspiegel als negativer Prognoseindikator für die Herzinsuffizienz angesehen. Trotz vollständiger ACE-Hemmung, z.B. in der **Valsartan Heart Failure-Studie**, (27,69) und sogar durch eine Kombinationstherapie bestehend aus ACE-Hemmern und AT1-Rezeptorblockern, in der **RESOLVD-Pilotstudie** (Randomized Evaluation of Strategies for Left Ventricular Dysfunction) (94) konnte die Aldosteronproduktion bei Herzinsuffizienz-Patienten nicht wesentlich reduziert werden. Dies lässt auf eine Angiotensin II-unabhängige Aldosteronproduktion schließen. Weitere Erklärungsmodelle für dieses Phänomen sind der „Aldosteron-Escape“ und der „Angiotensin-Aldosteron-Circulus vitiosus“.

*Katada et al.* (70) konnten zeigen, dass selbst bei Angiotensin II Typ1A-Rezeptor Knockoutmäusen nach Myokardinfarkt noch ein signifikantes Remodeling mit Hypertrophie und kardialer Dysfunktion vorzufinden war. Ebenso blieben die Genexpression der Aldosteronsynthase CYP11B2 und der kardiale Aldosteronspiegel bei den Versuchstieren erhöht, während sich die Plasmaspiegel nicht signifikant veränderten. Die Behandlung mit Spironolacton normalisierte das Remodeling, wohingegen ein ACE-Hemmer keinen zusätzlichen Nutzen bei den Knockoutmäusen erzielen konnte. Dies lässt vermuten, dass es sich bei den Umbauvorgängen nach Myokardinfarkt zumindest teilweise um Angiotensin II-unabhängige Mechanismen handelt und somit eine alleinige Blockade der Renin-Angiotensin-Achse nicht auszureichen scheint, um die kardiale Aldosteronproduktion und das Remodeling nach Infarkt zu verhindern. Diese Mechanismen sind jedoch noch nicht geklärt. Die Beteiligung eines steroidogenen Corticotropin-Rezeptors, MC2R, der für eine Hochregulation von CYP11B2 und somit Aldosteron sorgt, wird diskutiert, da die MC2R-Rezeptorexpression bei den Knockoutmäusen dieser Studie signifikant erhöht war.

Unter „Aldosteron-Escape“ versteht man den Wiederanstieg des Plasmaaldosterons, sogar über den Ausgangsspiegel hinaus, nach initialer Abnahme (69). Dieser Effekt tritt auch nach vollständiger Blockade des RAAS in Erscheinung. Möglicherweise stellt das durch ACE-Hemmer und AT1-Antagonisten ansteigende Kalium den sekretogenen Reiz für das vermehrte Plasmaaldosteron dar. Während eine lange Zeit gedacht wurde, dass Aldosteron nur in der Nebennierenrinde produziert wird, konnte kürzlich auch eine lokale Gewebesynthese im insuffizienten Herzen nachgewiesen werden, die mitunter für die schädlichen Wirkungen des Aldosteron-Escape verantwortlich ist. Die kardiale Aldosteronsynthese basiert auf der Expression von CYP11B2 (Aldosteronsynthase) nach schädlichen Einflüssen wie z.B. einem Myokardinfarkt, ebenso kann Aldosteron selbst die CYP11B2-Expression über einen Feedback-Mechanismus regulieren (138, 139). Beim insuffizienten Herzen konnten sowohl eine erhöhte Genexpression der Aldosteronsynthase CYP11B2 als auch eine Hochregulation des MR festgestellt werden (173,174). Die Aktivierung der Aldosteronsynthese ist hierbei proportional zum Ausmaß der Herzinsuffizienz (99). Selbst in adrenaletomierten, spontan hypertensiven Ratten konnten erhöhte Aldosteronspiegel gemessen werden, was auf eine von der

Nebenniere unabhängige, lokale Mineralkortikoidproduktion hindeutete. Der Aldosteronantagonist Spironolacton zeigte sogar bei diesen Tieren eine kardioprotektive Wirkung und verhinderte eine kardiale Hypertrophie (139,142). Die Behandlung mit MR-Antagonisten zusätzlich zur RAAS-Blockade würde somit also das kardiale Remodeling nach Myokardinfarkt positiv beeinflussen.

Dem „Angiotensin-Aldosteron-Teufelskreis“ liegt der Mechanismus des positiven Feedbacks zugrunde: Aldosteron kann sowohl die Expression von ACE und somit die Angiotensinspiegel erhöhen, als auch die physiologische Herunterregulation der AT1-Rezeptoren verhindern. Somit sorgt Aldosteron für eine steigende Angiotensin II-Wirkung, was wiederum eine höhere Aldosteronsynthese zur Folge hätte – ein Circulus vitiosus entsteht. Eine Blockade der Aldosteronwirkung nimmt hier die Schlüsselrolle für die Unterbrechung des Teufelskreises ein (112).

Dies unterstreicht die Notwendigkeit einer additiven MR-Blockade, um die negativen Effekte des Steroidhormons am kardiovaskulären System zu mildern. Dennoch ist noch wenig über die Mechanismen bekannt, die dem klinischen Benefit einer Kombination aus MR-Antagonismus und ACE-Hemmung oder AT1-Rezeptorblockade bei Patienten mit Herzinfarkt und chronischer Herzinsuffizienz zugrunde liegen. Darüber hinaus stellt sich weiterhin die Frage, ob eine intensivere Hemmung des RAAS durch kombinierte ACE-Hemmung, Angiotensin-Antagonismus und Aldosteron-Rezeptorblockade nach Infarkt einen additiven Nutzen bringt.

Die Erkenntnisse über die Rolle von Aldosteron im kardiovaskulären System legen nahe, dass eine pharmakologische Beeinflussung durch MR-Blockade zu positiven Effekten im Hinblick auf ventrikuläres Remodeling und kardiale Funktion bei Herzinsuffizienz beitragen könnte.

Klinische Studien zeigen, dass der MR-Antagonismus eine beachtliche Verbesserung der Mortalität nach Myokardinfarkt bewirkt. Im Jahre 1999 wurde durch die **RALES-Studie** (Randomized Aldactone Evaluation Study) (117) aufgezeigt, dass bei herzinsuffizienten Patienten (NYHA Stadium III und IV) durch die additive Gabe des Aldosteron-Antagonisten Spironolacton zur Basistherapie mit einem ACE-Hemmer, Digitalis und Diuretikum nicht nur eine Mortalitätssenkung um 30%, sondern auch eine Verbesserung der linksventrikulären Auswurfleistung und der Belastbarkeit erzielt

werden konnte. Als Ursache für diese Mortalitätsreduktion wird neben der verminderten Natrium- und Wasserretention die Hemmung einer aldosteronbedingten Myokardfibrosierung diskutiert. Die Bedeutung dieses Mechanismus wird durch die Tatsache gestützt, dass in einer Untergruppe der Patienten der RALES-Studie eine Verminderung von Serummarkern der Kollagensynthese unter Therapie mit Spironolacton nachgewiesen wurde (175).

In der **EPHESUS-Studie** (Eplerenone Post acute myocardial infarction Heart failure Efficacy and SURvival Study) (115,116) war eine selektive MR-Blockade mit Eplerenon, die zwischen dem 3. und 14. Tag nach Infarkt zusätzlich zu der optimalen Standardtherapie begonnen wurde, mit einer frühzeitigen und andauernden Mortalitäts-senkung verbunden. Dabei schienen die Patienten, die frühzeitig (3-7 Tage) der Behandlung zugeteilt wurden, einen größeren Gewinn davonzutragen, als diejenigen, die später (7-14 Tage) randomisiert wurden. Demzufolge könnten bessere Ergebnisse durch eine sofortige Eplerenontherapie nach Infarkt erreicht werden.

Darüber hinaus konnten *Hayashi et al.* (61) aufzeigen, dass eine unmittelbare MR-Blockade mit Spironolacton über einen Monat zu einer Verbesserung des linksventrikulären Remodelings bei Patienten mit Vorderwandinfarkt führt. Die Ejektionsfraktion des linken Ventrikels wurde verbessert und das enddiastolische Volumen ebenso wie die myokardiale Kollagenbildung reduziert.

In der vorliegenden Studie wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass eine MR-Blockade die Heilung und Reparatur des infarzierten Myokards begünstigt. Demnach wurde der Effekt einer Kurzzeitbehandlung (7 Tage) mit dem selektiven Aldosteron-Antagonisten Eplerenon, die unmittelbar nach Koronarligatur begonnen wurde, auf Hämodynamik, Infarktexpansion und Neovaskularisation bei herzinsuffizienten Ratten im Infarktmodell untersucht.

Eplerenon (Inspra<sup>®</sup>) ist ein neuer selektiverer MR-Antagonist für die Behandlung der systemischen Hypertonie und chronischen Herzinsuffizienz. Zur jetzigen Zeit ist das Medikament nur in den USA für die Hypertoniebehandlung zugelassen, entweder alleine oder in Kombination mit anderen Wirkstoffen. Eplerenon bindet selektiv an den

MR und blockiert damit eine Aldosteronbindung, was folglich die Na<sup>+</sup>-Reabsorption und andere deletäre Aldosteronwirkungen hemmt (68). Im Gegensatz zum erstbeschriebenen nichtselektiven MR-Antagonisten Spironolacton sind die ungünstigen progestogenen und antiandrogenen Nebenwirkungen (Gynäkomastie, Brustschmerzen und erektile Dysfunktion bei Männern, sowie Libidoverlust und Menstruationsbeschwerden bei Frauen), aufgrund geringerer Affinität zu Androgen- und Progesteronrezeptoren, nicht vorhanden. Die Tatsache, dass Eplerenon viel besser toleriert wird, eröffnet die Möglichkeit dieser Therapie bei kardiovaskulären und renalen Krankheiten. Strukturchemisch wurde die 17 $\alpha$ -Thioazetyl-Gruppe von Spironolacton durch eine Carbomethoxy-Gruppe ersetzt (23).

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Studienprotokoll und Myokardinfarkt**

#### **2.1.1 Versuchstiere**

Die vorliegende Studie wurde mit erwachsenen, männlichen Wistar-Ratten (Charles River, Deutschland) durchgeführt. Ihr Gewicht zum Zeitpunkt des experimentellen Myokardinfarkts betrug 200-250 g. Die Tiere waren über den gesamten Zeitraum in einem klimatisierten Tierstall untergebracht und hatten freien Zugang zu Wasser und Futter. Für die Einhaltung konstanter Umweltbedingungen waren sie einem zwölfstündigen Tag-Nacht-Zyklus unterworfen.

#### **2.1.2 Myokardinfarzierung**

Der experimentelle Myokardinfarkt bei den Ratten wurde durch eine Ligatur des Ramus interventrikularis anterior der linken Koronararterie (RIVA) herbeigeführt. Dazu wurden die Tiere, nach Messung des Körpergewichts, mit Isofluran narkotisiert und intubiert. Anschließend wurden sie mit einem speziellen Beatmungsgerät für Nagetiere (*Rodent Ventilator 7025, Ugo Basile, Italien*) kontrolliert beatmet. Die Beatmungsfrequenz betrug 90/min, das Atemzugvolumen 2,5 ml.

Nach Desinfektion der linken Thoraxhälfte wurde die Haut mit einer Schere eröffnet, die Pektoralismuskulatur stumpf präpariert und mittels Spreizen der Rippen durch den Interkostalraum in den Thorax eingegangen. Das Herz wurde nach Eröffnung des Perikards durch seitlichen Druck herausluxiert und der Ramus interventrikularis anterior der linken Koronararterie (RIVA) dargestellt. Mit einem 5-0 Prolene Monofilfaden (*Ethicon, Deutschland*) konnte nun der RIVA an proximaler Stelle umstochen und ligiert werden. Das Herz wurde anschließend wieder reponiert und der Thorax schichtweise mittels vorgelegter Tabaksbeutelnaht verschlossen. Die Tiere wurden ab diesem

Zeitpunkt mit Carbogen (95% O<sub>2</sub>+5% CO<sub>2</sub>) beatmet. Abschließend folgte der Hautverschluss durch Metallclips. Etwa 5-10 Minuten postoperativ konnte bei den Tieren eine ausreichende Spontanatmung festgestellt werden, woraufhin man sie extubierte und in den Käfig zurückbrachte. Es folgte eine Beobachtungszeit von fünf Stunden, in der die Ratten bei auftretenden Herzrhythmusstörungen durch eine Herz-Druck-Massage reanimiert werden konnten. Die Letalität der infarzierten Tiere postoperativ betrug 30%. Zur Kontrolle diente eine Gruppe von Tieren, die bei gleicher chirurgischer Vorgehensweise eine Scheinoperation (Sham) erhielten, wobei nur eine Fadenschlinge um den RIVA gelegt wurde, keine Ligatur. Für die späteren Auswertungen kamen nur Tiere mit einer Infarktgröße > 40% in Betracht.

### 2.1.3 Einteilung in die Versuchsgruppen und Medikation

Unmittelbar nach der Operation wurden die überlebenden Tiere für eine Eplerenon- (100 mg/kg KG) oder Placebobehandlung (5% Gummiarabikum) randomisiert. Die Eplerenondosis wurde aus vorherigen Studien übernommen, in denen der selektive Aldosteronantagonist beachtliche Schutzwirkungen auf das Herz und die Niere hypertensiver Ratten ausübte (127). Die Medikamente wurden einmal täglich für zwei, drei oder sieben Tage über eine Schlundsonde verabreicht. Scheinoperierte Tiere erhielten eine Placebobehandlung. In ergänzenden experimentellen Gruppen wurde eine Eplerenon- oder Placebobehandlung erst am Tag drei nach Myokardinfarkt begonnen. Nach Ende der Behandlungsdauer wurden hämodynamische Messungen durchgeführt und das Herz der Tiere für weitere Untersuchungen vorbereitet.

Einteilung der Versuchstiere in drei Behandlungsgruppen:

Tiere <i>ohne</i> Infarkt ( <b>SHAM</b> )	Behandlung mit <b>Placebo</b>
Tiere <i>mit</i> Infarkt	Behandlung mit <b>Placebo (PLA-MI)</b>
	Behandlung mit <b>Eplerenon (EPLE-MI)</b> 100 mg/kg KG

### 2.2 Behandlung mit liposomumkapseltem Clodronat

Die Ratten erhielten zwei Injektionen mit je 2 ml liposomumkapseltem Clodronat, um eine Monozyteninfiltration in das Infarktgebiet bis zu zwei Tage nach Myokardinfarkt zu verhindern. Die Injektionen wurden ein Tag vor der Koronararterienligatur und 24 Stunden nach dem Eingriff verabreicht. Das liposomumkapselte Clodronat (Clodr-lip) wurde nach der Methode von *Van Rooijen et al.* vorbereitet (163). Das Clodronat (Dichlormethylenbisphosphonat) wurde von der Roche Diagnostik GmbH (Mannheim, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Clodronatliposomen werden von Phagozyten aufgenommen. Die intrazelluläre Freigabe von Clodronat während der enzymatischen Liposomenspaltung innerhalb der Makrophagen verursacht Apoptose und einen gezielten Abbau dieser Zellen (163).

### 2.3 Häodynamik und linksventrikuläre Volumenmessungen

Die hämodynamischen Messungen fanden sieben Tage nach dem experimentellen Myokardinfarkt statt. Bei den Tieren wurden der linksventrikuläre systolische (LVSP) und enddiastolische Druck (LVEDP), der rechte Vorhofdruck (RAP) sowie die Druckänderung über die Zeit ( $dp/dt_{\max}$  bzw.  $dp/dt_{\min}$ ) unter leichter Isoflurananästhesie und spontaner Atmung mit Hilfe eines Mikromanometers (*Millar Tip-Catheter Pressure Transducer SPC-350, Millar Instruments, USA*) gemessen. Dazu wurde unter Isofluranarkose die rechte A. carotis operativ dargestellt und nach zweifacher Ligatur mit 4-0 Permaseidefäden (*Ethicon*) ein Kochsalz-gefüllter Katheter (*PE 50, Portex, England*) über das Gefäß in den linken Ventrikel vorgeschoben. Die Kontrolle der Lage erfolgte anhand der gemessenen Druckkurve. Über einen Dreiwegehahn war der Katheter mit dem Mikromanometer zur Druckmessung verbunden.

Die Druck-Volumenmessungen erfolgten mit dem Conductance-Katheter (*SPR-774, Millar Instruments, USA*), einer nach *Baan et al.* entwickelten Technik (8). Hierzu wurde der Katheter über die A. carotis in den linken Ventrikel eingebracht und so lange korrigiert, bis sich die Druck-Volumen-Kurven gut darstellen ließen. Hiermit konnte

das linksventrikuläre endsystolische (LVESV) bzw. enddiastolische Volumen (LVEDV) bestimmt werden. Für die Berechnung des Blutvolumens im linken Ventrikel muss das sog. Parallel-Volumen  $V_p$  vom kalibrierten Volumen abgezogen werden. Der durch die inneren Elektroden des Conductance-Katheters applizierte Strom fließt nämlich nicht nur durch das linksventrikuläre Blut, sondern teilweise auch durch den umgebenden Herzmuskel. Hierdurch würde ein falsch hoher Wert für das Blutvolumen entstehen, weshalb eine Korrektur um  $V_p$  erfolgen muss. Zur Ermittlung des Parallel-Volumens  $V_p$  wurden 15 bis 20  $\mu$ l hypertone Kochsalzlösung (5%) über den Katheter in die V. jugularis injiziert. Dies führte zu einer Veränderung der Leitfähigkeit des Blutes im linken Ventrikel, ohne eine signifikante Druck- oder Volumenänderung herbeizuführen. Die erfolgreiche Durchführung war an einer Rechtsverschiebung der Druck-Volumen-Kurven erkennbar. Die Berechnung der hämodynamischen Daten wurden mittels PVAN 2.8-Software (*Millar Instruments*) durchgeführt, womit auch ein Wert für  $V_p$  bestimmt werden konnte. Die Druck-Volumen-Signale wurden mittels BioBench Software (*National Instruments, USA*) verarbeitet.

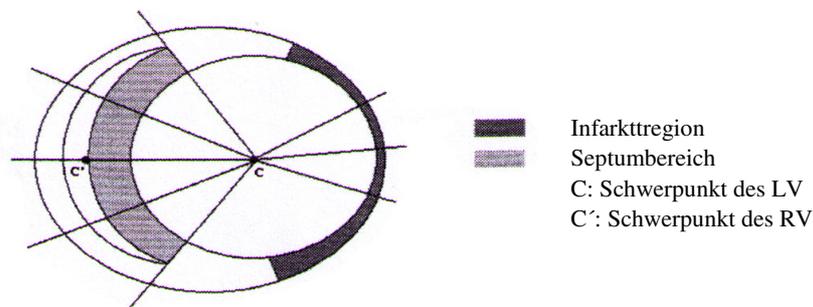
### 2.4 Infarktgrößenbestimmung und Expansionsindex

Für die Messung der Infarktausdehnung brachte man das Herz der Tiere durch eine intravenöse KCl-Injektion zum Stillstand und legte es in eiskalte KCl-Lösung, um eine einheitliche Verhaftung in diastolischem Zustand zu erreichen. Mit 4% phosphatgepuffertem Formalin wurde der LV 60 Minuten perfundiert und fixiert. Anschließend wurden 7  $\mu$ m-Schnitte in 1 mm-Intervallen von der Spitze bis zur Herzbasis geschnitten, auf einen Objektträger aufgebracht und mit Picrosirius-Rot gefärbt. Diese Schnitte konnten nun in 25-facher Vergrößerung (Axioskop2, Zeiss, Deutschland) in einem Mikroskop eingestellt und über eine Videokamera mit Videoschnittstelle (*DLX-930 P, Sony, Japan*) digitalisiert werden. Mit dem Programm SigmaScan Pro5 (*Jandel Scientific, USA*) war es möglich, für jeden Schnitt die relative Infarkt Narbenlänge und den LV Umfang endokardial und epikardial zu bestimmen. Für die Ermittlung des Expansionsindex wurde jeweils der Querschnitt herangezogen, der die Mitte des linken Ventrikels darstellte und die größte Hohlraum dilatation aufwies (43). Fünf gleichmäßig

verteilte Radianten wurden durch den Infarkt gelegt, mit Schwerpunkt des LV als Bezug und die durchschnittliche Infarktstärke daraus berechnet. Die nichtinfarzierte LV Septumstärke wurde in gleicher Weise gemessen (Abbildung 6). Die gewonnenen Werte dienten zur Ermittlung der prozentualen Infarktgröße. Der Expansionsindex berechnete sich aus der Formel:

Expansionsindex = (LV Hohlraum/Gesamtfläche des LV) × (Septumstärke/Narbenstärke)

Die Infarktgröße wurde als Mittelwert aller Schnitte angegeben.



**Abbildung 6:** Darstellung des Herzquerschnitts, der jeweils für die Messungen des Expansionsindex, der Septumstärke und der Narbenstärke verwendet wurde. *Septumstärke:* Mittelwert aus fünf Septumwandmessungen. Fünf gleichmäßig verteilte Radianten wurden durch den linksventrikulären Mittelpunkt C gelegt, wobei der zentrale Radiant C und C' verbindet. *Narbenstärke:* Mittelwert aus fünf Infarkt wandmessungen, wobei der zentrale Radiant durch C und den dünnsten Bereich der Infarkt wand verläuft. Die Radianten sind jeweils durch 22,5° voneinander getrennt. Nach Fraccarollo (43).

### 2.5 Leukozyten, Aldosteron und Corticosteron

Zur Bestimmung der Leukozyten-, Aldosteron- und Corticosteronspiegel wurde morgens von der rechten A. carotis eine Blutprobe entnommen. Die Messung der peripheren Leukozyten erfolgte mit dem Hämatology-Messgerät (*XT 2000i, Sysmex, Deutschland*). Die Bestimmung der Aldosteron- (*Sorin Biomedica*) und Corticosteronkonzentrationen (*MP Biomedicals*) im Plasma erfolgte mit einem kommerziellen Radioimmunoassay nach Herstelleranweisungen. Das Plasmaaldosteron wurde in pg/ml, die Corticosteronkonzentration in ng/ml angegeben.

### 2.6 Immunhistochemie

Immunhistochemische Untersuchungen wurden mit einem Anti-Faktor XIIIa (*Ab 1834, Abcam*), -CD68 (*MCA341R, Serotec*), -CD4 (*550297, BD Biosciences Pharmingen*), -CD31 (*550300, BD Biosciences Pharmingen*) - $\alpha$ -Aktin des glatten Muskels (*VPS281, Vector*) und Myeloperoxidase (*Ab25989, Abcam*)-Antikörper an 5  $\mu$ m dicken Gefrierschnitten des LV durchgeführt.

Die Schnitte wurden für fünf Minuten in kaltem Azeton fixiert, gefolgt von einer Behandlung mit 0,3% Wasserstoffperoxid für 20 Minuten, um die endogene Peroxidaseaktivität zu unterdrücken. Anschließend wurden die Schnitte mit 2% Pferdeserum für 30 Minuten geblockt und für eine Stunde mit dem ersten Antikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Spülen mit PBS folgte die Inkubation der Schnitte mit einem Biotin-markierten Antimäus-Antikörper (*BA-2001, Vector Laboratories*) für 30 Minuten. Für die Färbung wurde der Vectastain Elite ABC kit (*PK-6100, Vector Laboratories*) und Diaminobenzidin (*SK4100, Vector Laboratories*) verwendet. Die zweimalige immunhistochemische Färbung zur Erkennung der Gefäßneubildung wurde mit Diaminobenzidin für CD31 und dem HistoGreen HRP Substrate kit (*E109, Linaris*) für das  $\alpha$ -Aktin der glatten Muskulatur durchgeführt. Danach fand eine Gegenfärbung der Schnitte mit Hämatoxylin oder Eosin statt.

### 2.7 Biochemische Studie

#### 2.7.1 Gewebeprobenentnahme

Eine gesonderte Tiergruppe wurde für die biochemischen Auswertungen herangezogen. Dafür wurde das Herz der Ratten in eiskalter isotoner Kochsalzlösung in rechten und linken Ventrikel inklusive interventrikulärem Septum aufgeteilt. Zur Bestimmung der Herzinfarktgröße wurde der linke Ventrikel auf Objektträger flach gedrückt und so konnten die Begrenzungslinien der infarzierten und nichtinfarzierten epi- und endokardialen Flächen bestimmt werden. Da die Auswirkung einer sofortigen Mineral-

kortikoid-Rezeptorblockade auf die Infarktheilung untersucht werden sollte, folgte anschließend die sorgfältige Trennung des überlebenden Myokards von der Infarktzone des linken Ventrikels, die im Verlauf weiter untersucht wurde (43).

### 2.7.2 Probenaufbereitung für die Proteinanalyse

#### Homogenisierung und Extraktion:

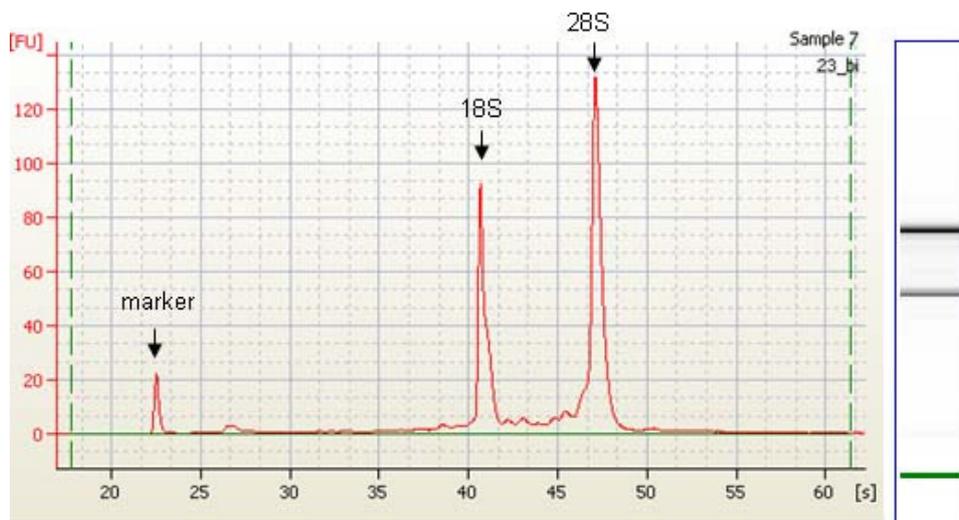
Der linke Ventrikel (Infarktareal) wurde unter flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zermörsert und in eiskaltem *RIPA-Puffer* lysiert. Dieser war folgendermaßen zusammengesetzt:

NaCl	150 mmol/l
Tris-Cl	50 mmol/l
EDTA	5 mmol/l
Nonidet P-40	1% v/v
Desoxycholat	0.5% w/v
NaF	10 mmol/l
Natriumpyrophosphat	10 mmol/l
Phenylmethylsulfonylfluorid	100 mmol/l
Aprotinin	2 µg/ml
Leopeptin	2 µg/ml

Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (20 min, 8000g, 4°C), der Überstand aliquotiert und bei -80°C zur späteren Verarbeitung eingefroren. Die entstandenen Pellets wurden 30 min in 0,06N HCl gewaschen und nochmals bei 8000g zentrifugiert. Danach wurden sie für mehrere Tage getrocknet und für die Hydroxyprolinbestimmung verwendet.

### 2.7.3 Genexpressionsanalyse mittels Mikroarray

Die Gewebeproben des linken Ventrikels (infarziertes Myokard oder Freiwand von Sham-Tieren) wurden unter flüssigem Sickerstoff zu einem feinen Pulver zerrieben. Ca. 50 mg dieses Pulvers wurden dann sofort in 1 ml *TRIzol-Reagenzlösung* (*Invitrogen GmbH*, Karlsruhe) homogenisiert und das Homogenisat zu je 10000g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde die RNA durch abpipettieren der oberen wässrigen Phase isoliert; die RNA wurde mit einem *RNeasy Mini Kit* (*Qiagen*) gereinigt. Nach Quantifizierung der RNA mittels UV-Spektrophotometrie wurde ihre Qualität mit dem *Bioanalytiker 2100* (*Agilent Technologies*, Deutschland) beurteilt (Abbildung 7).



**Abbildung 7:** Beispiel einer RNA-Analyse von Herzgewebe mit dem Bioanalytiker 2100

Die RNA-Proben wurden in biotinylierte cRNA umgewandelt und mit dem *Affymetrix GeneChip<sup>®</sup> Rat Expression Array 230 2.0* gemäß Herstellerangaben hybridisiert (Abbildung 8). In der Erststrang-cDNA-Synthese wurde 2 µg Gesamt-RNA zuerst mithilfe eines T7-Oligo(dT) Primers umgeschrieben. Im Anschluss an die RNase H-vermittelte Zweitstrang-cDNA-Synthese wurde die doppelsträngige cDNA aufbereitet und diente als Matrize in der nachfolgenden in-vitro Transkription. Diese Reaktion wiederum wurde in Gegenwart der T7 RNA Polymerase und eines biotinylierten Ribonukleotid-Gemisches durchgeführt, für die komplementäre RNA (cRNA)-Vervielfältigung und Biotin-Markierung. Die biotinylierten cRNA's wurden anschließend gereinigt, fragmentiert und in *GeneChip expression arrays* hybridisiert. Diese Untersuchungsreihe wurde mit Streptavidin-Phykoerythrin-Konjugat gefärbt und vom GeneArray<sup>®</sup> Scanner gelesen. Die Menge des emittierten Lichts bei 570 nm ist proportional der begrenzten Vorgabe an jeder Stelle der Untersuchungsreihe. Die Mikroarray-Datenanalyse wurde unter Verwendung von *R packages* vom *Bioconductor*, *open source software for Bioinformatics*, <http://www.bioconductor.org/> durchgeführt.

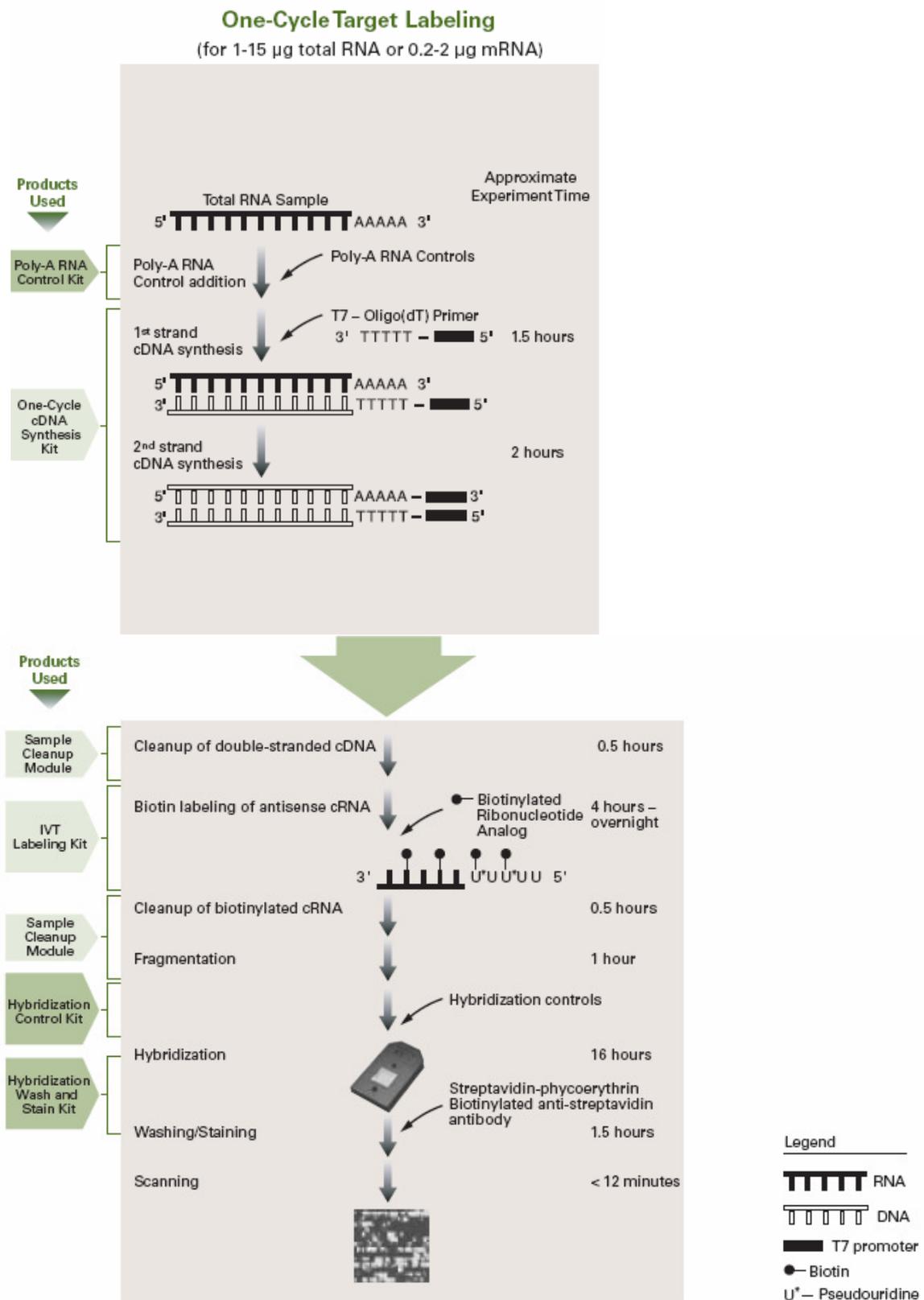


Abbildung 8: Prinzip der Mikroarray-Analyse (GeneChip® Expression Analysis Technical Manual, Affymetrix)

### 2.7.4 Western Blot

Für die Western Blot-Analyse wurden die Proben (infarziertes Myokard) in eiskaltem RIPA-Puffer homogenisiert. Der Proteingehalt wurde mittels Bradford Protein Assay (*Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad*) bestimmt. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt, wobei das Polyacrylamidgel aus einem Sammel- und einem Trenngel bestand.

Zur Vorbereitung der Proteinproben wurden jeweils 20 µg der normalisierten Proben mit Loading Buffer versetzt und fünf Minuten bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden je 10-30 µl Probe pro Tasche auf einem 10%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und unter reduzierenden Bedingungen getrennt. Als Referenz dienten Precision Plus Protein Standards (*Bio-Rad*). Nun folgte der Elektrotransfer der Proteine auf eine PVDF-Membran (*Immun-Blot<sup>®</sup> 0,2 µm, Bio-Rad*). Hierfür wurde das Trenngel in ein Transfersandwich eingebettet, das von der Kathodenseite zur Anodenseite aus Schaumstoff, Filterpapier, Trenngel, PVDF-Membran und wieder Filterpapier und Schaumstoff bestand. Das Blotting erfolgte über 90 Minuten bei 100 V. Nach dem Transfer der Proteine wurden sie in TBST (*Tris-buffered Saline Tween*) mit 5% ECL-Blocking Agent (*Amersham Biosciences*) über Nacht inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren. Am nächsten Tag wurde die Membran mit dem jeweiligen spezifischen Primärantikörper gegen das Protein bei Raumtemperatur für zwei Stunden in TBST mit 0,5% ECL-Blocking Agent inkubiert. Es wurden Primärantikörper gegen Faktor XIIIa (*Ab 1834, Abcam*), phosphoryliertes Akt (*9271, Cell Signaling Technology*), MCP-1 (*555072, BD Biosciences Pharmingen*) und GAPDH (*Ab 8245, Abcam*) eingesetzt. Nach mehrmaligem Waschen in TBST folgte dann die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (*Anti-mouse IgG, Amersham*) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Dieser war mit Meerrettichperoxidase konjugiert und ermöglichte so den Nachweis der spezifischen Banden durch eine Chemilumineszenz-Reaktion (*ECL Plus, Amersham*). Die Blots wurden auf Autoradiographiefilmen (*Hyperfilm<sup>TM</sup>ECL, Amersham*) dargestellt und densitometrisch mittels Scion Image for Windows Beta 4.0.2 (*Scion Cooperation, USA*) ausgewertet.

### 2.7.5 Zytokine

Die Proteinkonzentrationen von MCP-1 wurden mit der Western Blot-Analyse bestimmt. Für die Messung der IL-1 $\beta$  Konzentration verwendete man einen handelsüblichen *ELISA Kit (RLB00, R&D Systems)*. Hierbei handelt es sich um ein quantitatives Sandwich-Enzym-Immunoassay, bei dem mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen IL-1 $\beta$  beschichtete Mikrotiterplatten verwendet wurden. Nach Zugabe der Proben und Inkubation bei Raumtemperatur kam es zu einer Bindung der darin enthaltenen Zytokine an die spezifischen Primärantikörper. Durch einen Waschvorgang wurden alle ungebundenen Proteine entfernt. Danach erfolgte die Zugabe des polyklonalen, spezifischen Sekundärantikörpers gegen IL-1 $\beta$ , der an ein Enzym gekoppelt war. Nach anschließender Inkubation und erneutem Waschvorgang, der die Reste der ungebundenen Antikörper-Enzym-Reagenzien entfernte, folgte die Zugabe eines Farbindikators. Hierunter kam es durch enzymatische Umsetzung zu einer Farbentwicklung, die proportional zur Menge von IL-1 $\beta$  ist und photometrisch bestimmt wurde.

Zur Quantifizierung der Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 und IL-4 wurde das *Bioplex Protein Array System (Bio-Rad)* entsprechend den Herstellerangaben angewandt, mit welchem in einem Ansatz simultan mehrere Proteine analysiert werden können. Das Prinzip funktioniert analog eines modifizierten Sandwich-Immunoassays. Hierbei sind verschiedene monoklonale zytokinspezifische Antikörper kovalent an unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Polystyrenkügelchen (so genannte Beads) gebunden. In einer Mikrotiterplatte wurden die Proben, beziehungsweise ein bekannter Standard, zusammen mit den Antikörper-gekoppelten Beads in die Plattenwells pipettiert und für 30 Minuten auf einem Schüttler bei 300 rpm inkubiert. Hierbei wurden die im Überstand präsenten Zytokine an den auf der Oberfläche der Beads haftenden Antikörper gebunden. Anschließend wurde die Platte mittels Vakuumfiltration gewaschen und ein zweiter biotinylierter Detektionsantikörper zugegeben, der spezifisch an ein anderes Epitop der gesuchten Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 und IL-4 bindet. Danach wurde die Platte für weitere 30 Minuten unter gleichmäßigem Schütteln

inkubiert. Nach Entfernung von überschüssigem Detektionsantikörper mittels erneuter Vakuumfiltration wurde Phycoerythrin-konjugiertes Streptavidin zugegeben. Es folgte ein dritter 10-minütiger Inkubationsschritt sowie weitere Waschschriffe, um das ungebundene Streptavidin zu entfernen. Die Quantifizierung der Zytokine erfolgte im Array Reader (*Bio-Rad*).

### 2.7.6 Zymographie und reverse Zymographie

Die SDS-Gel-Zymographie diente zum Nachweis der Aktivität von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) 2 und 9 sowie der Metalloproteinasen-Gewebeinhibitoren (TIMP) 1 und 2.

Die Gewebeproben (infarziertes Myokard) für die Zymographie wurden in einem eiskalten Extraktionspuffer (pH 0.5) bestehend aus cacodylischer Säure (10 mmol/l), NaCl (0.15 mol/l), ZnCl<sub>2</sub> (1 µmol/l), CaCl<sub>2</sub> (20 mmol/l), NaN<sub>3</sub> (1.5 mmol/l) und 0.01% Triton X-100 homogenisiert (43). Durch diese elektrophoretische Technik wird die proteolytische Aktivität in Enzymen nachgewiesen, die zuvor auf einem Polyacrylamidgel unter nichtreduzierenden Bedingungen getrennt wurden. Jeweils 4 µg der Proben, verdünnt mit physiologischem Loading Buffer, wurden auf ein 10% SDS-Polyacrylamidgel (*Bio-Rad*) aufgetragen, das 1 mg/ml Gelatine (TypA von Schweinehaut) enthält und für ca. 1,5 Stunden bei 180V unter nichtreduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt. Um das SDS aus dem Gel zu entfernen und das Enzym zu aktivieren, wurde das Gel anschließend dreimal für jeweils 15 Minuten auf einem Laborschüttler mit PBS (+2,5% Triton X-100) gewaschen. Das Gel mit den aufgetrennten MMPs wurde anschließend für ca. 15 Stunden in Tris-Puffer bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die im Puffer enthaltenen Ca<sup>2+</sup>-Ionen ermöglichen die enzymatische Aktivität sowohl der Pro- als auch der aktivierten MMPs. Die im Gel vorhandene Gelatine wird auf der durch die Elektrophorese festgelegten Höhe der MMP-Formen verdaut, wobei auch die Proform nach Autoaktivierung das Substrat umsetzt. Die im Gel vorhandene intakte Gelatine wurde nun mit Coomassie-Brillantblau (0,5% in 40% Methanol, 10% Essigsäure) 30 Minuten auf dem Schüttler gefärbt und viermal für insgesamt ca. 30 Minuten mit Entfärbelösung (40% Methanol und 10%

Essigsäure) gewaschen, bis sich die MMPs als weiße Banden gegen den blauen Hintergrund des Gels abzeichneten. Zur Dokumentation wurden die Gele eingescannt und die gelatinolytischen Banden mit Hilfe der Image Software Quantity One (*Bio-Rad*) ausgewertet. Durch Vergleich mit Standards der pro- und aktivierten MMPs können die erhaltenen Bandenmuster den jeweiligen Formen zugeordnet werden. Die reverse Zymographie erfolgte in gleicher Weise, wobei jedoch gereinigtes MMP-2 (30 ng/ml, Calbiochem) in ein 12% SDS-Polyacrylamidgel zusammen mit 1 mg/ml Gelatine eingebettet wurde (43).

### 2.7.7 Hydroxyprolinbestimmung

Das getrocknete infarzierte Myokardareal wurde gewogen und in 1ml/10mg Trockengewicht 6N HCl bei 110°C für 24 Stunden hydrolysiert. 50 µl Probe wurde mit der gleichen Menge NaOH 6N neutralisiert und mit Chloraminlösung (7% Chloramin-T in Citrat-Acetat-Puffer) oxidiert. Anschließend kam es durch die Zugabe von Ehrlich'scher Lösung (Dimethylamino-benzaldehyd) in 60%-iger Perchlorsäure zu einer Komplexbildung mit Hydroxyprolin. Dieser Komplex konnte dann spektrophotometrisch (*Ultrospec 3100 Pro, Amersham*) bei 558 nm gemessen werden. Unter der Annahme, dass Kollagen durchschnittlich 13,4% Hydroxyprolin enthält, wurde der Kollagengehalt in µg/mg Trockengewicht Gewebe angegeben (43).

## 2.8 Statistische Auswertung

Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (mean $\pm$ SEM) angegeben. Die Vergleiche zwischen den Gruppen MI-Placebo und MI-Eplerenon wurden mit dem *Student-t-Test* analysiert. In den hämodynamischen und biochemischen Messungen wurde die statistische Analyse mittels *One-Way-ANOVA* durchgeführt, gefolgt von mehrfachen Vergleichen unter Verwendung von *Fisher's protected least-significant difference test*. Zusammenhänge konnten durch die lineare Regressions-

## 2. Material und Methoden

---

analyse festgestellt werden. Für die statistischen Auswertungen wurde mit dem *StatView 5.0* Statistikprogramm (*Abacus Concepts, Berkley, CA, USA*) gearbeitet. Alle Werte mit  $p < 0.05$  wurden als statistisch signifikant angesehen.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Globale Parameter**

Nach einwöchiger Behandlung mit Placebo oder dem selektiven Aldosteron-antagonisten Eplerenon ergaben sich hinsichtlich des Körpergewichts der Tiere keine bedeutenden Unterschiede zwischen den drei Behandlungsgruppen. Tabelle 1 zeigt Daten zu Infarktgröße, Ventrikelmorphologie und Hämodynamik in den verschiedenen Studiengruppen am siebten postoperativen Tag.

**Tabelle 1: Globale Parameter** der scheinoperierten (Sham) und der mit Placebo (PLA) oder Eplerenon (EPL) behandelten Ratten 7 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt (MI).

	<b><u>Sham</u></b>	<b><u>PLA-MI</u></b>	<b><u>EPL-MI</u></b>
<i>n</i>	10	20	20
MI (%)	-	48±1	48±1
KG (g)	300±5	263±9	270±6
LVSP (mmHg)	132±7	104±3*	107±3*
LVEDP (mmHg)	5.4±0.5	25.5±1*	16.9±1*†
RAP (mmHg)	5.6±1	8.12±0.5*	6.47±0.5†
LV dP/dtmax (mmHg/s)	5783±326	3373±156*	4102±165*†
LV dP/dtmin (mmHg/s)	4494±220	2621±133*	3112±115*†
LVESV (µl)	150±17	469±28*	352±26*†
LVEDV (µl)	421±26	713±29*	608±26*†
LV Ejektionsfraktion (%)	67±3	37±2*	47±3*††

Mittelwerte±SEM. \*p<0.05 vs. Sham; †p<0.05, ††p<0.01 vs. PLA-MI

### 3.2 Infarktgrößen

Die durchschnittlichen Infarktgrößen nach zwei, drei oder sieben Tagen Behandlung waren unter den experimentellen Gruppen bei Placebo- bzw. Eplerenongabe und der mit Clodr-lip behandelten Tiere vergleichbar (Tabelle 2).

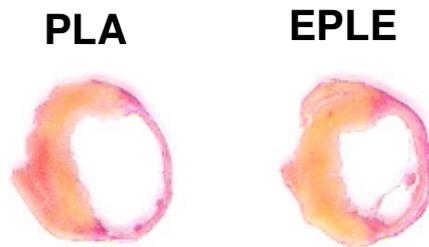
**Tabelle 2:** Die *Infarktgrößen* sind in allen Studiengruppen mit durchschnittlich 48% vergleichbar. (Sham=scheinoperierte Tiere; PLA-MI=Placebo-behandelte Tiere nach Myokardinfarkt; EPLE-MI=Eplerenon-behandelte Tiere nach Myokardinfarkt; Clodr-lip=zusätzliche Behandlung mit liposom-umkapseltem Clodronat). Angegeben als Mittelwert±SEM.

	<u>Tage nach Myokardinfarkt</u>		
	<b>2 Tage</b>	<b>3 Tage</b>	<b>7 Tage</b>
<u>Infarktgröße (%)</u>			
Sham	-	-	-
PLA-MI	49±1	46±1	48±1
EPLE-MI	53±1	48±1	48±1
Clodr-lip PLA-MI			46±2
Clodr-lip EPLE-MI			49±1

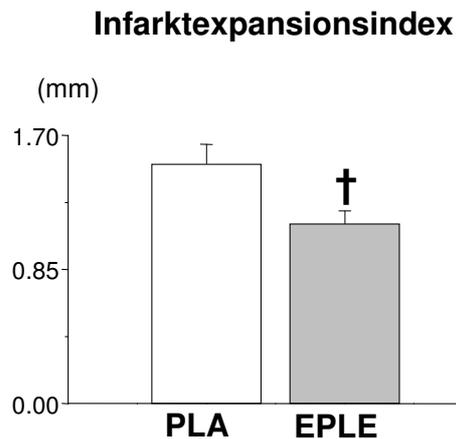
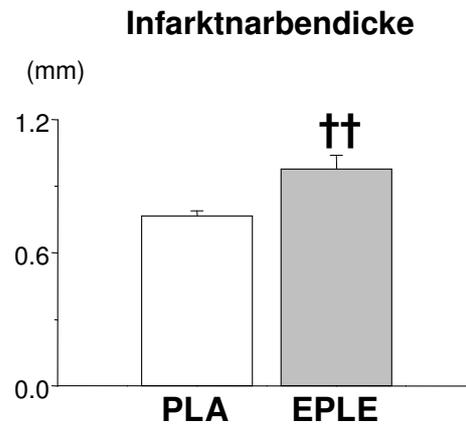
### 3.3 Ventrikelmorphologie

#### Infarktnebendicke und Infarktexpansionsindex:

Eine unmittelbare MR-Blockade mit Eplerenon nach Myokardinfarkt erhöhte im Vergleich zu Placebo die Narbendicke nach sieben Tagen bedeutsam. Gleichzeitig kam es zu einer Verminderung der Infarktexpansion, was in einer deutlichen Verbesserung der frühen linksventrikulären Dilatation bemerkbar war. Die herzinsuffizienten Tiere wiesen eine enorme Erweiterung des linken Ventrikels auf, die durch den selektiven Aldosteronantagonisten sichtbar reduziert werden konnte (siehe Abbildung 9a und 9b).



**Abbildung 9a:** *Querschnitte aus der Mitte des linken Ventrikels* (Picrosirius-Rot-Färbung) sieben Tage nach Myokardinfarkt. Das Narbengewebe ist rot eingefärbt. Die Abbildung zeigt anteriore Infarkte, die eine Vergrößerung der linksventrikulären Hohlraumfläche zur Folge haben. Verglichen mit Placebo (PLA), kam es unter Eplerenontherapie (EPL) zu einer effizienten Verminderung der Ventrikeldilatation und einer deutlichen Zunahme der Infarktnebendicke sieben Tage nach der Operation.



**Abbildung 9b:** *Infarktnarbendicke und Infarktexpansionsindex* sieben Tage nach experimentellem Myokardinfarkt. Gegenüber der Placebogruppe (PLA) ist die Narbendicke der mit Eplerenon (EPLE) behandelten Tiere signifikant erhöht, während der Infarktexpansionsindex durch sofortige Mineralkortikoid-Rezeptorblockade deutlich vermindert wird. Mittelwerte±SEM. † p<0.05, †† p<0.01 vs. Placebo.

Eine Eplerenonbehandlung, die erst drei Tage nach experimentellem Myokardinfarkt begonnen wurde, reduzierte dagegen nicht wesentlich die Ausdünnung und Erweiterung des Infarktabschnitts (Infarktnarbendicke  $0.82 \pm 0.03$  mm; Infarktexpansionsindex  $1.22 \pm 0.05$ ).

### **3.4 Hämodynamik**

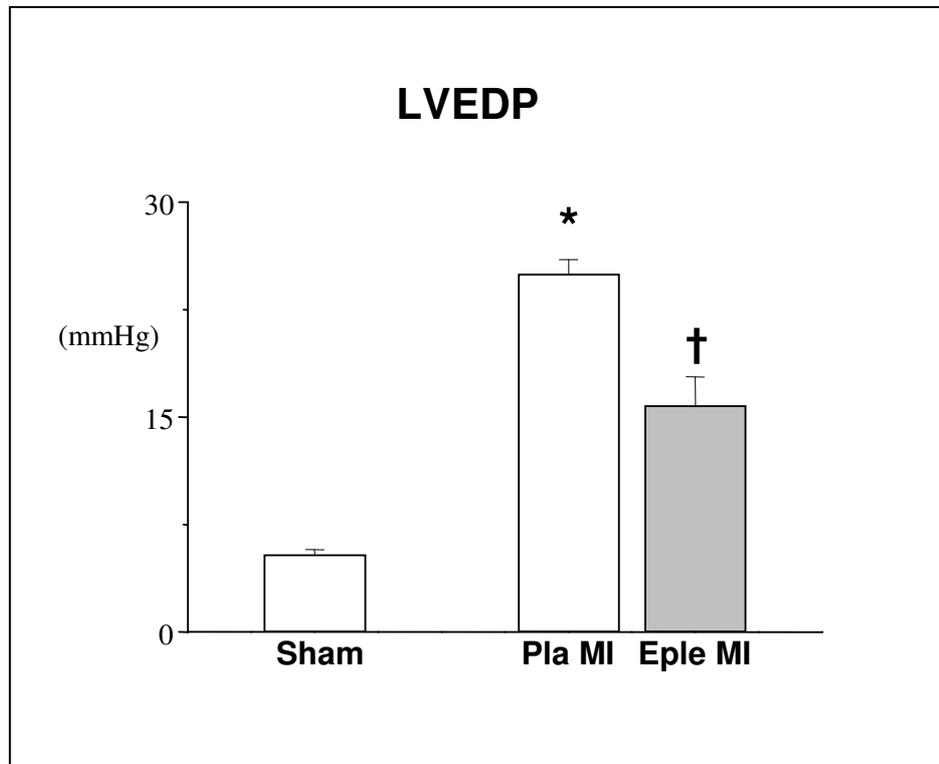
#### **3.4.1 Linksventrikulärer systolischer Druck (LVSP)**

Unabhängig von der Behandlungsart zeigte sich in allen Gruppen nach MI eine deutliche Verringerung des linksventrikulären systolischen Drucks gegenüber den Sham-Tieren. In Tabelle 1 (s. Seite 36) sind die Daten des LVSP sieben Tage nach Myokardinfarkt angegeben.

#### **3.4.2 Linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP)**

Der linksventrikuläre enddiastolische Druck hingegen war bei den infarzierten Tieren signifikant erhöht. Der enorme Anstieg des LVEDP vor allem bei den Placebotieren weist auf eine beginnende Herzinsuffizienz dieser Versuchsgruppe hin. Wie in Abbildung 10 zu erkennen, führte die unmittelbar postoperative Behandlung mit Eplerenon zu einer deutlichen Reduzierung des LVEDP gegenüber der Placebogruppe.

Eine drei Tage nach Infarkt begonnene Mineralkortikoid-Rezeptorblockade hingegen reduzierte den linksventrikulären Füllungsdruck nach einer Woche nur geringfügig ( $23 \pm 1$  mmHg), im Vergleich zur Placebogruppe.



**Abbildung 10: Linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP)** sieben Tage nach experimentellem Myokardinfarkt (MI). Gegenüber den scheinoperierten Tieren (Sham) ist der LVEDP bei den infarzierten Tieren der Placebogruppe (PLA) und der Eplerenongruppe (EPL) signifikant erhöht. Der sofortige Behandlungsbeginn mit Eplerenon hat jedoch einen positiven Effekt auf den LVEDP. Mittelwerte $\pm$ SEM. \* $p < 0.05$  vs. Sham; † $p < 0.05$  vs. PLA-MI.

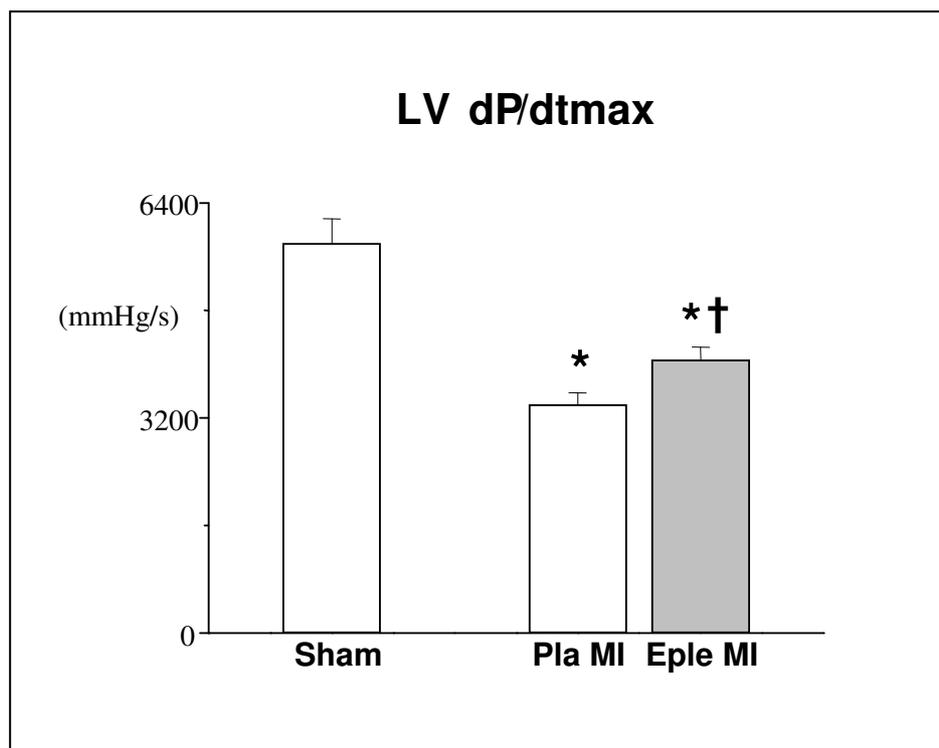
#### 3.4.3 Rechter Vorhofdruck (RAP)

Wie Tabelle 1 (s. Seite 36) zu entnehmen ist, zeigte sich entsprechend dem LV enddiastolischen Druck eine Erhöhung des rechten Vorhofdrucks bei den Infarkttieren, der sich wiederum unter Eplerenontherapie deutlich verringerte. Der signifikante Druckunterschied im rechten Vorhof zwischen der Placebogruppe und den scheinoperierten Tieren deutet ebenfalls auf die Entwicklung einer Herzinsuffizienz bei erstgenannter Gruppe hin. Durch die verminderte Pumpleistung des Herzens kommt es zu einem Rückstau des Blutes im linken Ventrikel und einem damit einhergehenden Druckanstieg im rechten Ventrikel sowie rechten Vorhof.

#### 3.4.4 Maximale linksventrikuläre Druckerhöhung- bzw. Druckerfallsgeschwindigkeit (LV $dP/dt_{max}$ bzw. LV $dP/dt_{min}$ )

Die maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit ( $dP/dt_{max}$ ) bzw. die maximale Druckerfallsgeschwindigkeit ( $dP/dt_{min}$ ) des linken Ventrikels war gegenüber den Sham-Tieren bei allen Versuchsgruppen erheblich vermindert. Unter Eplerenontherapie kam es jedoch zu einer deutlichen Verbesserung der Kontraktilitätsparameter wie in Abbildung 11 und Tabelle 1 (s. Seite 36) ersichtlich.

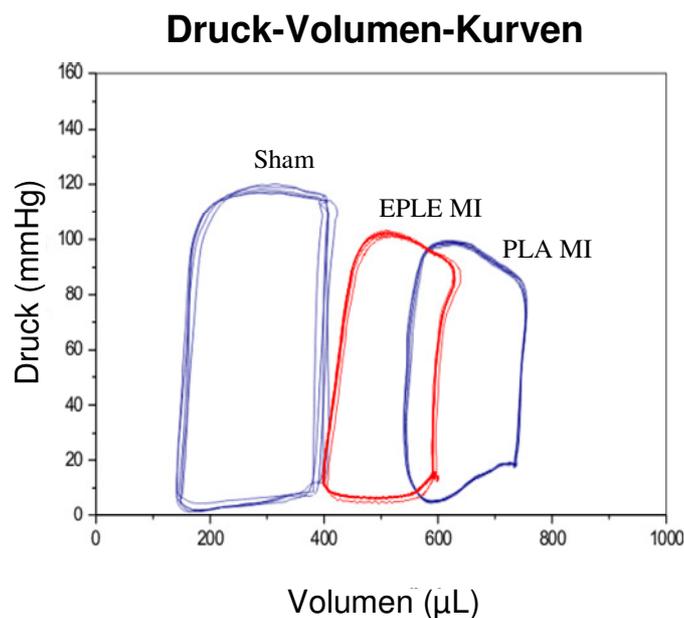
Wurde erst drei Tage postoperativ mit der Eplerenontherapie begonnen, kam es zu keiner beträchtlichen Verbesserung der frühen linksventrikulären Dysfunktion ( $dP/dt_{max}$   $3589 \pm 282$  mmHg/s;  $dP/dt_{min}$   $3013 \pm 243$  mmHg/s) gegenüber den mit Placebo behandelten Tieren.



**Abbildung 11:** Linksventrikuläre maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit ( $dP/dt_{max}$ ) sieben Tage nach experimentellem Myokardinfarkt (MI). Gegenüber den scheinoperierten Tieren (Sham) ist der maximale Druckerstieg im linken Ventrikel bei den infarzierten Tieren verringert. Unter sofortiger Behandlung mit Eplerenon (EPL) steigt der Wert gegenüber der Placebogruppe (PLA) wieder an. Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  vs. Sham; † $p < 0.05$  vs. PLA-MI.

#### 3.4.5 Druck-Volumen-Kurven

Unter Verwendung des Conductance-Katheters wurden Druck-Volumen-Kurven des linken Ventrikels aufgezeichnet um die weitere Herzfunktion zu beurteilen. Bei den hämodynamischen Messungen fiel eine typische Rechtsverschiebung dieser Kurven nach Myokardinfarkt auf, die durch eine sofortige Eplerenontherapie postoperativ zum Teil verhindert werden konnte. Abbildung 12 zeigt außer dem Verhältnis von links-ventrikulärem Druck und Volumen bei den drei Studiengruppen ein vermindertes Schlagvolumen sowie eine verringerte Herzarbeit bei den Infarkttieren im Gegensatz zur scheinoperierten Versuchsgruppe.



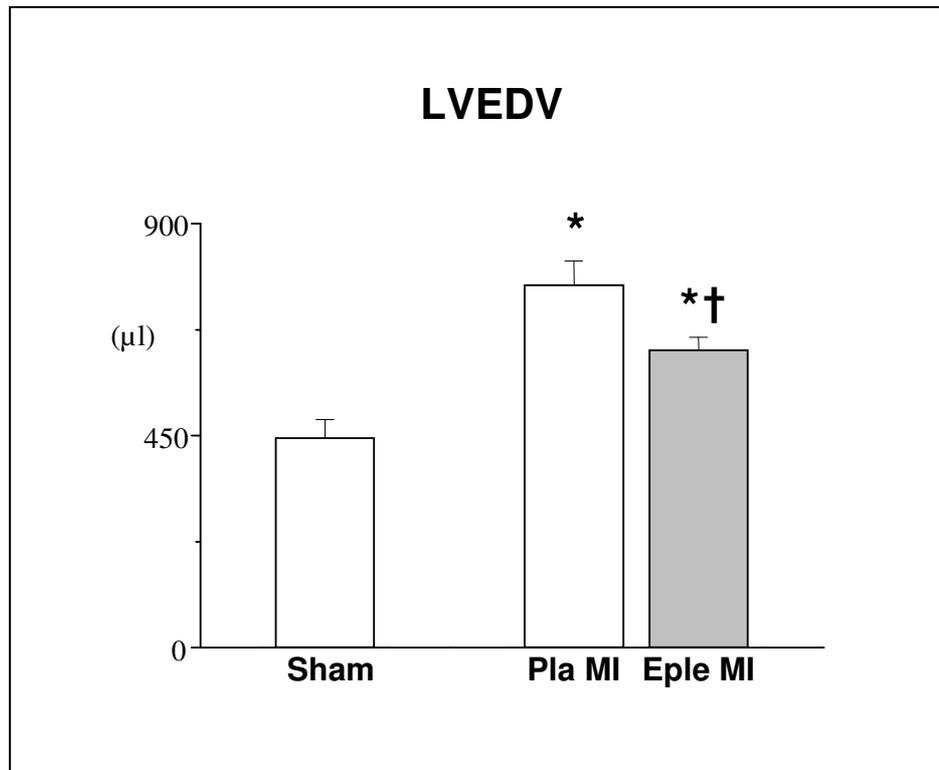
**Abbildung 12: Druck-Volumen-Kurven des linken Ventrikels.** In-vivo Messungen mit dem Conductance-Katheter bei scheinoperierten (Sham) und bei Placebo (PLA) bzw. Eplerenon-behandelten (EPLE) Ratten sieben Tage nach Myokardinfarkt (MI). Dabei kommt es zu einer typischen Rechtsverschiebung der Kurven. Die Herzarbeit wird durch die Fläche innerhalb der Druck-Volumen-Kurven dargestellt. Das Schlagvolumen ist jeweils durch den Abstand der beiden oberen Eckpunkte jeder Schleife definiert. Unter sofortiger Eplerenontherapie kann die Rechtsverschiebung der Kurven nach Infarkt positiv beeinflusst werden.

#### **3.4.6 Linksventrikuläres endsystolisches Volumen (LVESV)**

Das linksventrikuläre endsystolische Volumen (LVESV) stieg nach Myokardinfarkt bei den mit Placebo behandelten Tieren enorm an. Dies wird auch anhand der Daten in Tabelle 1 (s. Seite 36), an dem signifikanten Unterschied zur scheinoperierten Versuchsgruppe (Sham), verdeutlicht. Durch unmittelbare Behandlung mit Eplerenon nach Infarkt, ließ sich das LVESV wieder merklich verringern.

#### **3.4.7 Linksventrikuläres enddiastolisches Volumen (LVEDV)**

Ebenso wie beim linksventrikulären endsystolischen Volumen kam es sieben Tage nach experimentellem Myokardinfarkt zu einer Zunahme des linksventrikulären enddiastolischen Volumens (LVEDV), gegenüber den Sham-Tieren. Wiederum war der Volumenanstieg bei der Placebogruppe signifikant höher als bei der Eplerenongruppe, was auf den positiven Einfluss des selektiven Aldosteronantagonisten zurückzuführen ist. Dieser konnte das enddiastolische Volumen im linken Ventrikel deutlich reduzieren (Abbildung 13).



**Abbildung 13:** *Linksventrikuläres enddiastolisches Volumen (LVEDV)* sieben Tage nach experimentellem Myokardinfarkt (MI). Die Infarkttiere weisen eine signifikante Volumenzunahme gegenüber der scheinoperierten Versuchsgruppe (Sham) auf. Eine unmittelbare Eplerenonbehandlung (EPL) nach Infarkt führt zu einer deutlichen Reduktion des LVEDV im Vergleich zur Placebogruppe (PLA). Mittelwerte±SEM. \* $p < 0.05$  vs. Sham; † $p < 0.05$  vs. PLA-MI.

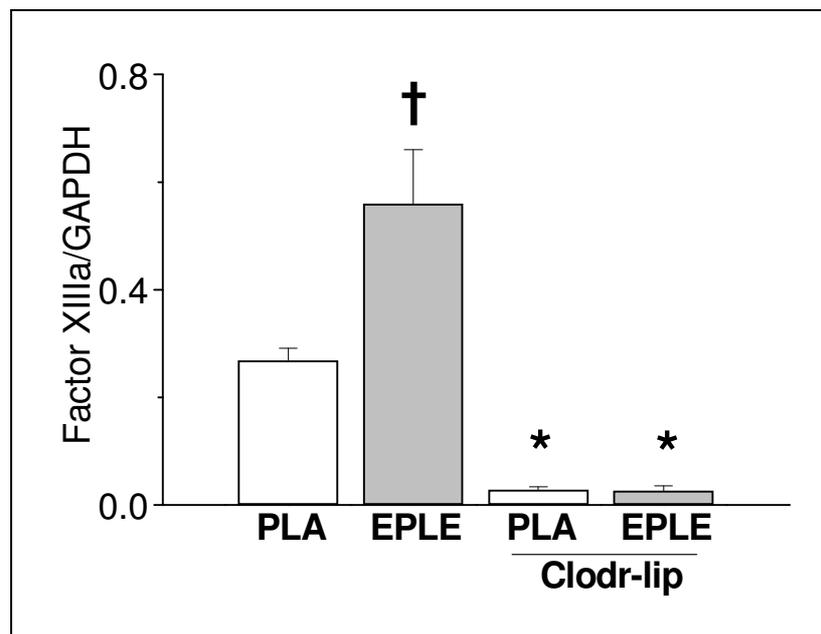
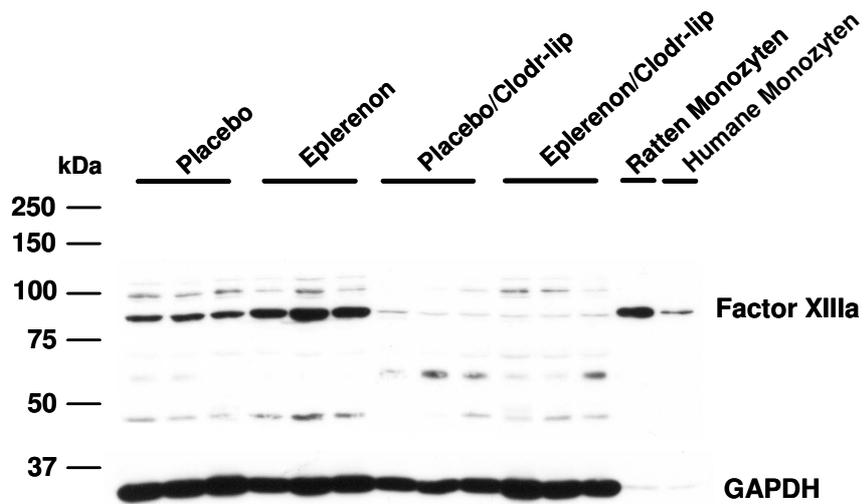
#### 3.4.8 Linksventrikuläre Ejektionsfraktion

Die linksventrikuläre Auswurfleistung der Infarkttiere war gegenüber den scheinoperierten Tieren (Sham) deutlich vermindert. Die nur mit Placebo behandelten Ratten wiesen eine linksventrikuläre Dysfunktion nach experimentellem Herzinfarkt auf, mit einer Ejektionsfraktion  $\leq 40\%$ . Eine unmittelbare MR-Blockade mit Eplerenon nach Myokardinfarkt, konnte die Ejektionsfraktion prozentual massiv verbessern. Die gewonnenen Daten der drei Behandlungsgruppen, sieben Tage nach Operation, sind in Tabelle 1 (s. Seite 36) dargestellt.

#### **3.5 Faktor XIIIa-Expression im Infarktgebiet**

Durch unmittelbare MR-Blockade nach Infarkt wurde die Genexpression in der Infarkt-wand reguliert, für deren Messung die Mikroarray-Technik verwendet wurde. Die Analyse der gesamten RNA, die aus dem Infarktgebiet isoliert wurde, zeigte unter Eplerenontherapie eine Erhöhung der Genexpression des Gerinnungsfaktors XIIIa (1,77-fach,  $p < 0.01$ ) drei Tage nach Myokardinfarkt. Faktor XIII spielt eine wichtige Rolle in der myokardialen Infarktheilung. Mäuse mit Faktor XIII-Mangel leiden unter Herzruptur, Infarktausdehnung und verstärkter linksventrikulärer Dilatation (102).

Die Faktor XIIIa-Expression im infarzierten Myokard wurde auch mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen. Wie aus Abbildung 14a hervorgeht, führte eine unmittelbare Behandlung mit Eplerenon nach Infarkt zu einer gesteigerten Faktor XIIIa-Expression im Infarktgebiet. Die Placebo-behandelten Tiere wiesen eine deutlich geringere Protein-expression des Gerinnungsfaktors auf.



**Abbildung 14a: Faktor XIIIa-Expression im Infarktgebiet** drei Tage nach Myokardinfarkt bei Ratten, die mit Placebo (PLA), Eplerenon (EPLE), liposomumkapseltem Clodronat (Clodr-lip) und Clodr-lip + EPLE behandelt wurden. Der sofortige Behandlungsbeginn mit Eplerenon führt gegenüber der Placebogruppe zu einer erhöhten Faktor XIIIa-Expression im infarzierten Myokard. Unter der Behandlung mit Clodr-lip wird die Faktor XIIIa-Expression nahezu aufgehoben. Mittelwerte $\pm$ SEM. \* $p < 0.001$  vs. PLA, EPLE; † $p < 0.05$  vs. Placebo.

### 3. Ergebnisse

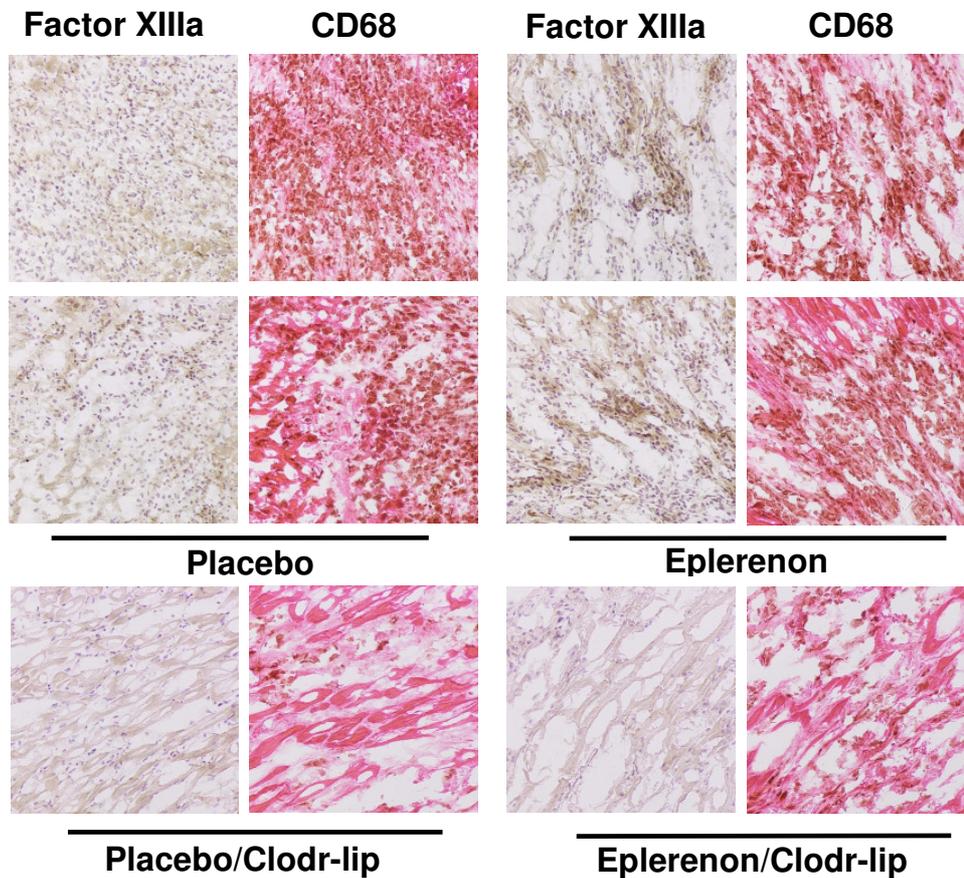
---

Die unmittelbar begonnene Eplerenonbehandlung nach Infarkt steigerte ebenso die Proteinkonzentration des phosphorylierten Akt1 im infarzierten Myokard nach drei Tagen. Während der Wert bei den Placebo-Tieren bei  $0,31 \pm 0,05$  lag, konnte dieser unter Therapie mit dem selektiven Aldosteronantagonisten auf  $0,72 \pm 0,1$  erhöht werden (Verhältnis pAkt/GAPDH,  $p < 0,05$ ).

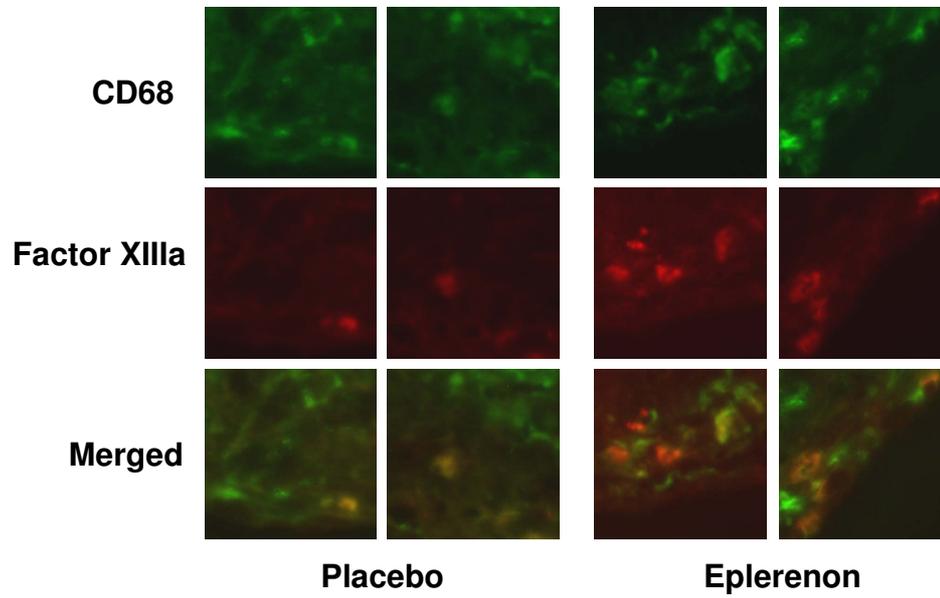
Im Gegensatz dazu, fand man sieben Tage nach Myokardinfarkt keinen Unterschied hinsichtlich der Faktor XIIIa-Expression und der Akt1-Phosphorylierung zwischen den mit Placebo und Eplerenon behandelten Tieren.

Da weder Myozyten und Endothelzellen noch glatte Muskelzellen oder Fibroblasten Faktor XIIIa exprimieren, wurden als nächstes Monozyten/Makrophagen untersucht. Von ihnen weiß man, dass sie den Gerinnungsfaktor produzieren. Nach Eplerenonbehandlung unmittelbar nach MI zeigte sich nicht nur eine gesteigerte Immunreaktivität für Faktor XIIIa, sondern auch eine erhöhte Anzahl Faktor XIIIa-positiver Makrophagen im infarzierten Myokard nach drei Tagen. Dieser positive Effekt auf die Infarktheilung konnte unter Placebobehandlung kaum beobachtet werden, was in den Abbildungen 14b und c verdeutlicht wird. Die in das Infarktgebiet eingewanderten Makrophagen exprimierten ebenso vermehrt den Faktor CD68, ein die Immunantwort modulierendes zytoplasmatisches Antigen.

Für die Untersuchung einer Monozyten/Makrophagenbeteiligung an der Faktor XIIIa-Expression hat man eine Tiergruppe herangezogen, die mit liposomumkapseltem Clodronat (Clodr-lip) behandelt wurde. In den Abbildungen 14b und c anschaulich dargestellt, kam es unter Clodr-lip-Behandlung zu einer signifikanten Reduktion der Monozyten/Makrophagen-Einwanderung in das Infarktgebiet drei Tage nach MI. Entsprechend wurde die Expression von Faktor XIIIa nahezu aufgehoben, was darauf hindeutet, dass Monozyten/Makrophagen die Ursprungsquelle dieses Faktors darstellt.



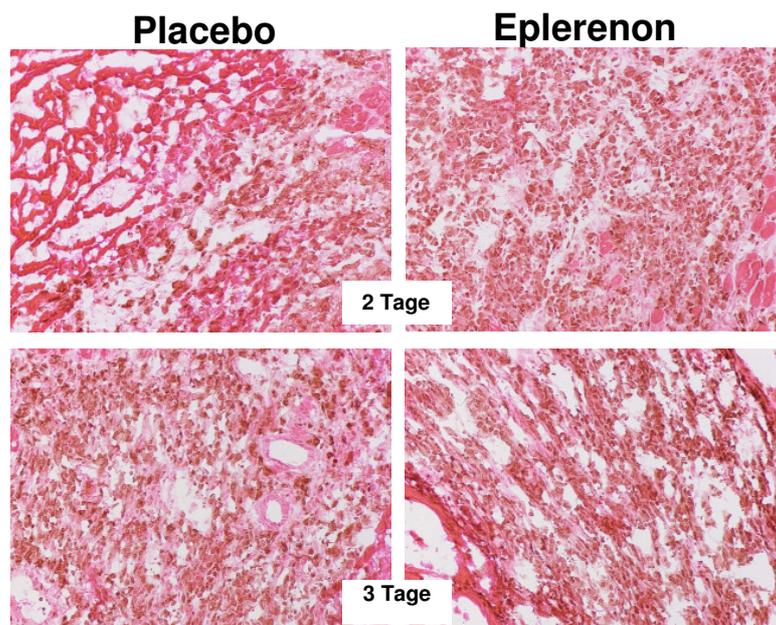
**Abbildung 14b: Faktor XIIIa-Immunreaktivität im Infarktgebiet** drei Tage nach Myokardinfarkt. Die immunohistochemische Färbung für Faktor XIIIa und CD68 zeigt eine vermehrte Immunreaktivität für Faktor XIIIa nach Eplerenonbehandlung. Die in das Infarktgebiet eingewanderten Makrophagen exprimieren den Gerinnungsfaktor XIIIa. Im Gegensatz zu Placebo führt eine unmittelbare Eplerenontherapie zu einer erhöhten Anzahl an Faktor XIIIa- und CD68-positiven Makrophagen im infarzierten Myokard. Eine Behandlung mit liposomumkapseltem Clodronat (Clodr-lip) reduziert die Makrophagen-einwanderung in das Infarktgebiet und führt folglich zu einer deutlich verminderten Faktor XIIIa-Expression (200fache Vergrößerung).



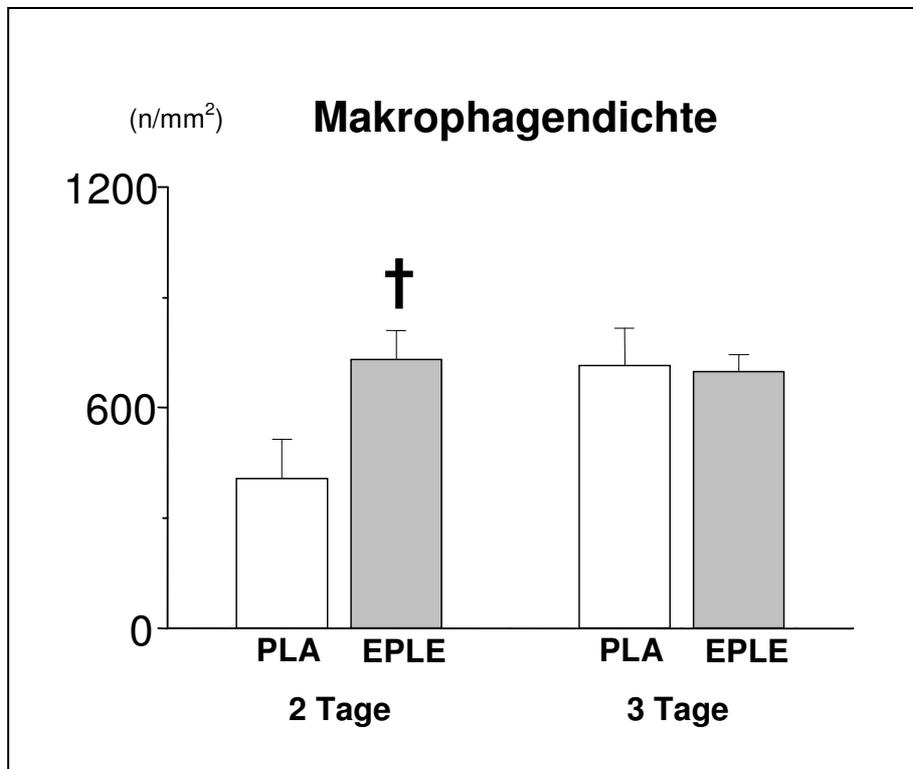
**Abbildung 14c:** *Faktor XIIIa-positive Makrophagen im Infarktgebiet* drei Tage nach Myokardinfarkt. Die Immunfluoreszenz-Doppelfärbung lässt deutlich mehr Faktor XIIIa-positive Makrophagen im infarzierten Myokard nach Behandlung mit Eplerenon erkennen (400fache Vergrößerung).

### 3.6 Monozyten/Makrophagen-Infiltration nach Myokardinfarkt

Die Anzahl an Makrophagen, die das heilende Myokard infiltriert haben, war bei Eplerenon-behandelten Tieren nach zwei Tagen deutlich höher als bei der Placebo-gruppe. Am dritten Tag nach Infarkt hatte sich jedoch die Makrophagendichte zwischen den beiden Studiengruppen wieder angeglichen. Selbst bei den Placebotieren war am darauf folgenden Tag ein vergleichbar großer Anstieg zu beobachten, wie den Abbildungen 15a und b zu entnehmen ist.

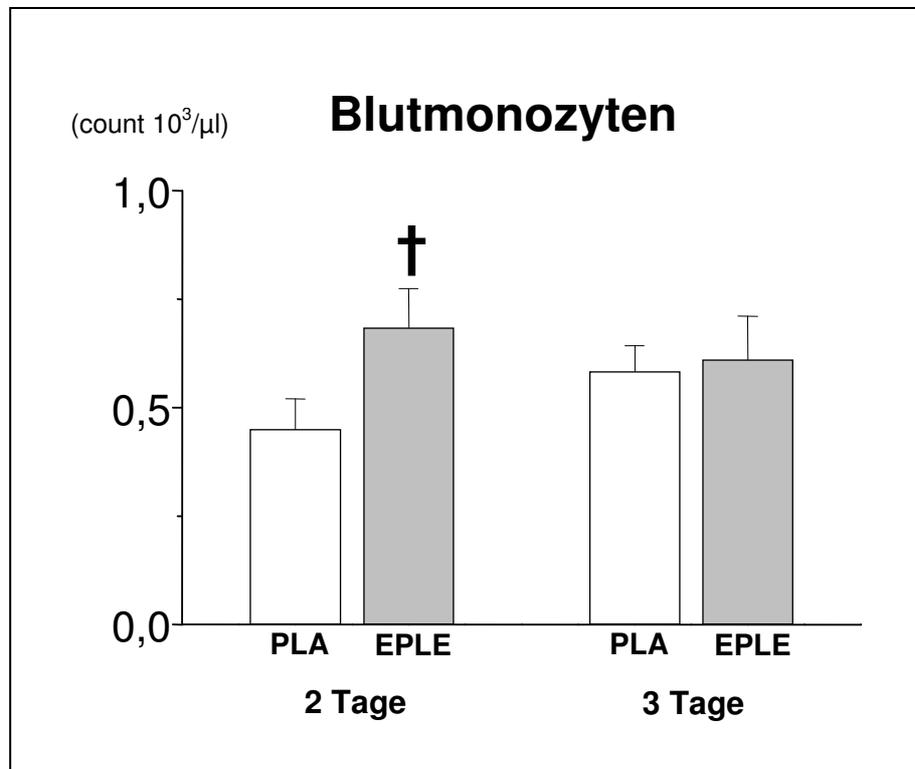


**Abbildung 15a:** *Monozyteninfiltration in das Infarktgebiet* zwei und drei Tage nach Myokardinfarkt. Die immunohistochemische Färbung zeigt eine durch die MR-Blockade beschleunigte Makrophagen-einwanderung in den infarzierten linken Ventrikel nach zwei und drei Tagen (200fache Vergrößerung).



**Abbildung 15b: Makrophagenansammlung im Infarktgebiet** zwei und drei Tage nach Myokardinfarkt. Unter sofortiger Eplerenontherapie (EPLE) kommt es zwei Tage nach MI zu einer signifikant höheren Makrophagendichte im heilenden Myokard, als bei der Placebogruppe (PLA). Drei Tage nach Myokardinfarkt hat sich die Makrophagenanzahl zwischen beiden Studiengruppen wieder angeglichen. Mittelwerte±SEM. †p<0.05 vs. Placebo.

Die zirkulierenden Blutmonozyten waren durch den Mineralkortikoid-Antagonismus zwei Tage nach Infarkt gegenüber der Placebogruppe beachtlich vermehrt. Drei Tage nach dem Infarkt ereignis hatten sich die Werte in den beiden Studiengruppen angeglichen. Zwischen den mit Placebo und Eplerenon behandelten Ratten war kein statistisch signifikanter Unterschied mehr zu beobachten (Abbildung 16).



**Abbildung 16:** *Zirkulierende Blutmonozyten* zwei und drei Tage nach Myokardinfarkt (MI). Die Eplerenontherapie (EPLE) führt zwei Tage nach MI zu einer erhöhten Monozytenanzahl im Blut, verglichen mit der Placebogruppe (PLA). Nach drei Tagen ist unter den beiden Studiengruppen jedoch kein signifikanter Unterschied mehr zu beobachten. Mittelwerte $\pm$ SEM. † $p < 0.05$  vs. Placebo.

Desweiteren wurden mehr infiltrierende CD4-positive T-Lymphozyten im infarzierten Myokard von Eplerenon-behandelten Tieren zwei und drei Tage nach Herzinfarkt gefunden, im Gegensatz zu den Placebo-Tieren (Tabelle 3). Diese könnten zu einer vermehrten Monozyteninfiltration in der ischämischen Region beitragen.

### 3. Ergebnisse

**Tabelle 3: CD4+ T-Zellen im Infarktgebiet** 2 und 3 Tage nach Myokardinfarkt (MI). Unter Eplerenontherapie (EPL-MI) steigt die Anzahl der Lymphozyten gegenüber der Placebogruppe (PLA-MI) deutlich an. Mittelwerte±SEM. p<0.05.

	<u>PLA-MI</u>	<u>EPL-MI</u>
<b><u>CD4+ T-Zellen</u></b> (n/Gesichtsfeld)		
2 Tage nach MI	0.60±0.08	1.62±0.6
3 Tage nach MI	0.62±0.1	1.40±0.2

Um die Hypothese zu prüfen, dass eine schnellere Induktion der Monozyteninfiltration in das ischämische Gebiet innerhalb zwei Tagen einen wichtigen Mechanismus darstellt, der den Vorteilen einer sofortigen selektiven MR-Blockade auf die Infarktausdehnung unterliegt, wurden die Auswirkungen der Behandlung mit liposomumkapseltem Clodronat untersucht.

Durch eine reduzierte Makrophagenansammlung im Infarktgebiet bis zu zwei Tage nach Myokardinfarkt wurden die positiven Effekte einer Eplerenonbehandlung sieben Tage nach Myokardinfarkt aufgehoben. Dies hatte Auswirkungen auf die Infarktarnbendicke, den Infarktexpansionsindex und die linksventrikuläre Funktion (Tabelle 4).

**Tabelle 4: Auswirkungen der Behandlung mit liposomumkapseltem Clodronat (Clodr-lip)** auf die Studiengruppen. Die positiven Wirkungen der Eplerenontherapie auf ventrikelmorphologische und hämodynamische Parameter werden durch Clodr-lip antagonisiert. Mittelwerte±SEM.

	<u>Clodr-lip+PLA-MI</u>	<u>Clodr-lip+EPL-MI</u>
Infarktarnbendicke (mm)	0.84±0.05	0.85±0.06
Infarktexpansionsindex	1.30±0.07	1.21±0.08
dP/dtmax (mmHg/s)	3848±99	3675±454
dP/dtmin (mmHg/s)	3085±292	3086±416

### 3.7 Aldosteron- und Corticosteronspiegel im Plasma

Die Aldosteron- und Corticosteronbestimmung im Plasma erfolgte aus Blutproben, die nach der unter Narkose erfolgten Hämodynamikmessung entnommen wurden.

Die Aldosteronspiegel waren nach Myokardinfarkt merklich erhöht, sie zeigten einen Höchstwert am Tag 1 und Tag 7 nach Infarkt (Tabelle 5).

**Tabelle 5: Plasmaaldosteronspiegel** 1 Tag und 7 Tage nach Myokardinfarkt (MI). Gegenüber den scheinoperierten Tieren (SHAM) ist der Aldosteronspiegel bei den Placebo-behandelten Tieren (PLA-MI) signifikant erhöht. Mittelwerte±SEM.

	<u>SHAM</u>	<u>PLA-MI</u>	
<u>Aldosteron (pg/ml)</u>			
1 Tag nach MI	122±48	822±197	(p<0.01)
7 Tage nach MI	144±36	613±91	(p<0.05)

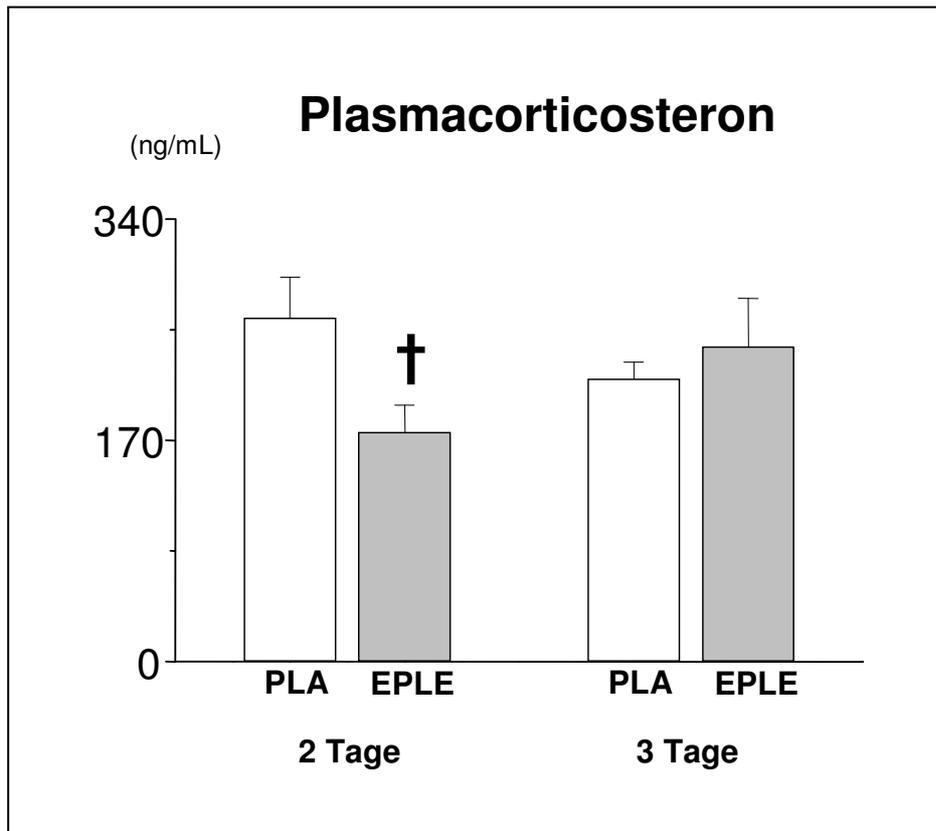
Da bekannt ist, dass Glukokortikoide die Anzahl der zirkulierenden und infiltrierenden Monozyten senken, wurde ebenso die Auswirkung einer sofortigen Mineralkortikoid-Rezeptorblockade auf die Plasmacorticosteronkonzentration untersucht. Der Plasmacorticosteronspiegel stieg in der Placebo-behandelten Infarktgruppe zwei Tage nach Myokardinfarkt sehr deutlich an. Ein unmittelbarer Aldosteronantagonismus konnte dieser Tendenz entgegensteuern, so dass der Plasmacorticosteronspiegel durch die Eplerenonbehandlung statistisch signifikant gesenkt wurde. Entsprechend den Untersuchungen der Monozyten/Makrophagenaktivität, konnte dieser positive Effekt drei Tage nach Infarkt nicht mehr nachgewiesen werden (Abbildung 17a).

Die Plasmacorticosteronspiegel wurden durch eine MR-Blockade zwei Tage nach Myokardinfarkt signifikant reduziert. Bedeutend ist, dass zirkulierende Blutmonozyten in einer negativen Korrelation mit der Plasmacorticosteronkonzentration stehen (Abbildung 17b). So kam es nach einer zweitägigen Eplerenonbehandlung an Ratten ohne Koronarligatur zu einem verminderten Corticosteronspiegel (Placebo: 246±12;

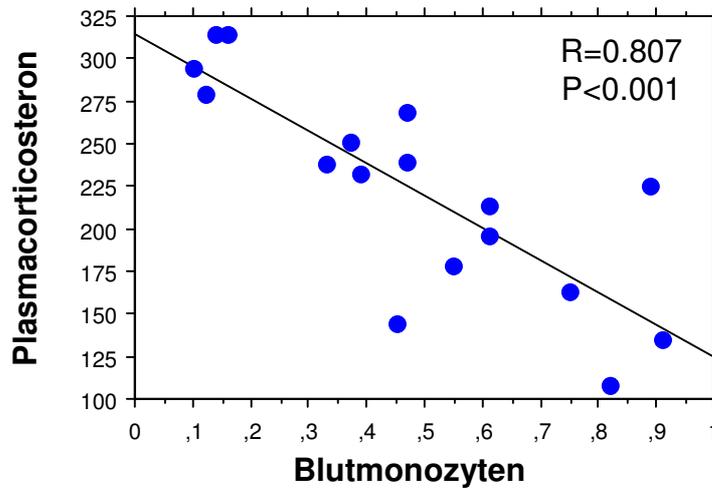
### 3. Ergebnisse

---

Eplerenon:  $207 \pm 9$  ng/mL;  $p < 0.05$ ) und einem Anstieg der zirkulierenden Monozyten von 32% ( $p < 0.05$ ).



**Abbildung 17a:** *Plasmacorticosteronspiegel* zwei und drei Tage nach Myokardinfarkt. Die Spiegel steigen unter Placebobehandlung (PLA) nach zwei Tagen an und werden durch eine sofortige Eplerenontherapie (EPLE) signifikant gesenkt. Nach drei Tagen ist dieser positive Effekt nicht mehr zu beobachten. Mittelwerte $\pm$ SEM. † $p < 0.05$  vs. Placebo.



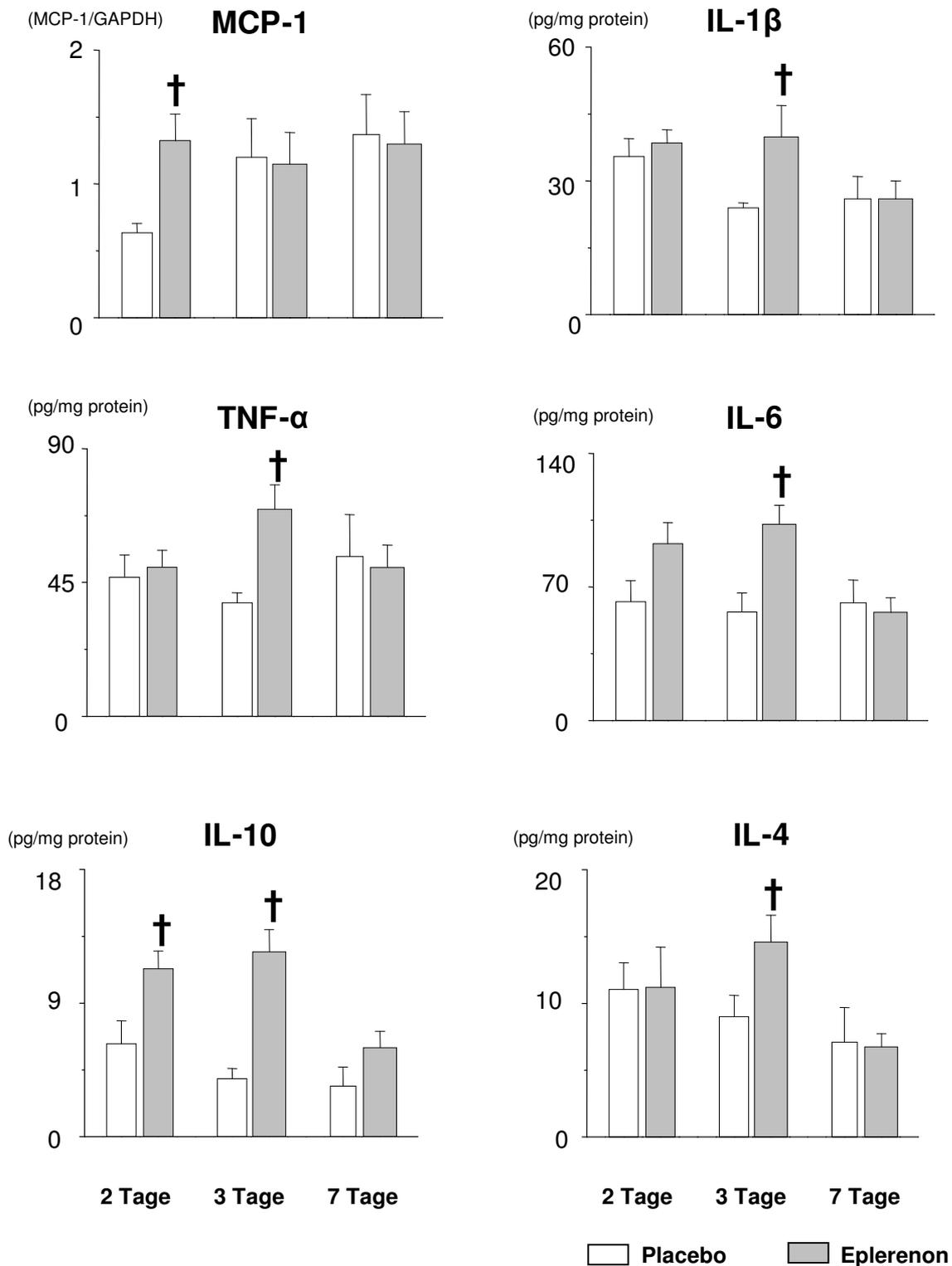
**Abbildung 17b:** *Verhältnis zwischen Plasmacorticoosteron und zirkulierenden Blutmonozyten zwei Tage nach Myokardinfarkt*

### 3.8 Proteinexpression im Infarktgebiet

Um den Einfluss von Eplerenon auf die Zytokinexpression im heilenden Myokard zu charakterisieren, wurden verschiedene Proteine im Infarktgebiet untersucht. Anhand der Messungen wurde deutlich, dass eine zunehmende Monozyten- und Lymphozyteninfiltration durch unmittelbare MR-Blockade nach Myokardinfarkt, mit einer vorübergehenden Erhöhung mehrerer Zytokine verbunden war (Abbildung 18).

Die Proteinspiegel des chemotaktischen Zytokins MCP-1 wurden, verglichen mit Placebo-behandelten Ratten, durch Eplerenon deutlich erhöht zwei Tage nach Infarkt. Bei den Zytokinen IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 und IL-4 kam es nach drei Tagen zu einem statistisch signifikanten Anstieg. IL-10 war jedoch schon am zweiten Tag nach Infarkt beachtlich erhöht. Bedeutend hingegen war die Feststellung, dass die MR-Hemmung keine Auswirkungen auf die Zytokinspiegel sieben Tage nach experimentellem Herzinfarkt hatte. Zu diesem Zeitpunkt war kein nennenswerter Unterschied zwischen der Placebogruppe und den mit Eplerenon behandelten Tieren mehr vorhanden.

### 3. Ergebnisse



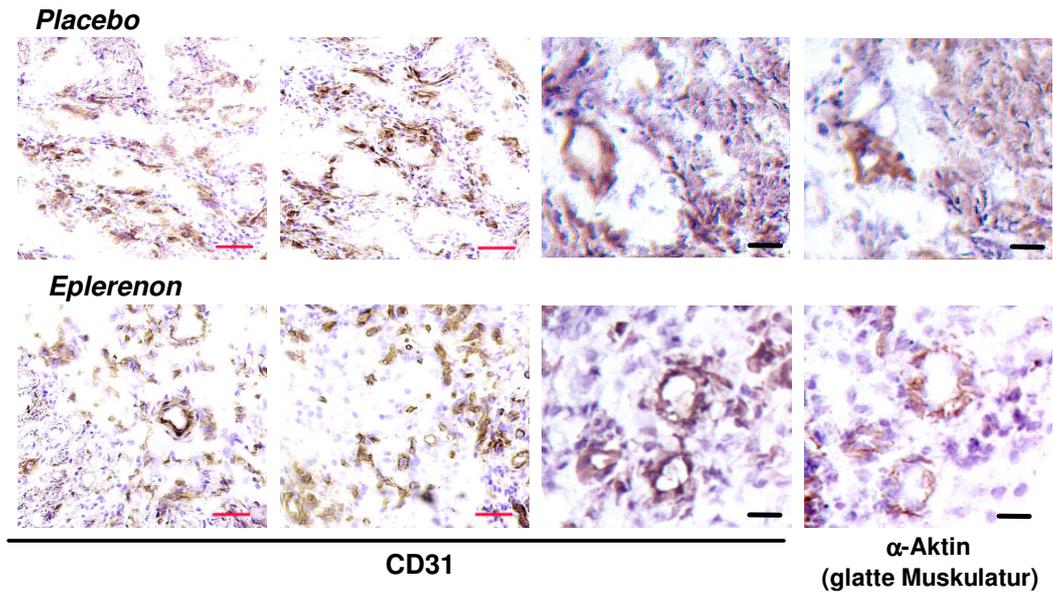
**Abbildung 18: Zytokinexpression im Infarktgebiet** zwei, drei und sieben Tage nach Myokardinfarkt. Durch unmittelbare MR-Blockade mit Eplerenon (EPL) kommt es zu einem vorübergehenden Anstieg mehrerer Zytokine im heilenden Myokard, verglichen zur Placebogruppe (PLA). MCP-1 und IL-10 weisen schon nach zwei Tagen eine signifikante Zunahme auf. IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-10 und IL-4 sind drei Tage nach Infarkt deutlich erhöht. Nach sieben Tagen ist bei beiden Studiengruppen jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied mehr zu beobachten. Mittelwerte±SEM. †p<0.05 vs. Placebo.

#### **3.9 Neovaskularisation im linken Ventrikel**

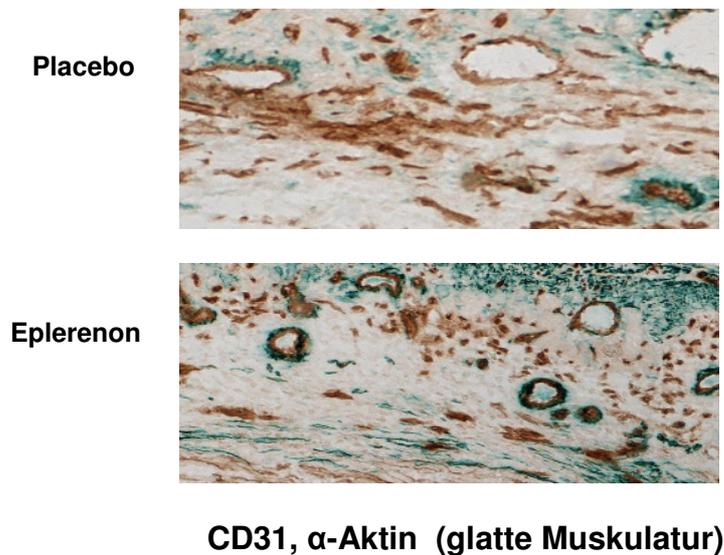
Um die Auswirkungen einer frühzeitigen MR-Blockade auf die Gefäßneubildung zu untersuchen, wurden für CD31 und das  $\alpha$ -Aktin der glatten Muskulatur immunhistochemische Färbungen durchgeführt. CD31, auch bekannt als PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1), ist ein 130 kDa schweres integrales Membranprotein, das wesentlich auf der Oberfläche von reifen und noch nicht ausgereiften Endothelzellen exprimiert wird. Die Färbungen zeigten unter Eplerenontherapie einerseits eine erhöhte Kapillardichte in der Narbe sowie Periinfarktregion, andererseits eine massive Vermehrung an ausgeweiteten, dünnwandigen und perizytenarmen Gefäßstrukturen sieben Tage nach Myokardinfarkt. Den kleinlumigen Kapillaren im heilenden Myokard fehlte vorerst eine Schicht aus glatter Muskulatur, die sich jedoch bei Entstehung der Infarktnarbe um viele Gefäße zur Stabilisation bildete. In diesen dünnwandigen vaskulären Strukturen konnte  $\alpha$ -Aktin der glatten Muskulatur gefunden werden. Gefäße ohne Muskelschicht bildeten sich hingegen zurück. Diese Erkenntnisse verdeutlichen, dass ein unmittelbarer Behandlungsbeginn nach Infarkt mit dem selektiven Aldosteronantagonisten Eplerenon die Neovaskularisation im heilenden Myokard beträchtlich verbessert. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 19 a-c, im Vergleich zu den Beobachtungen an Placebo-behandelten Tieren, eindrücklich dargestellt.

### 3. Ergebnisse

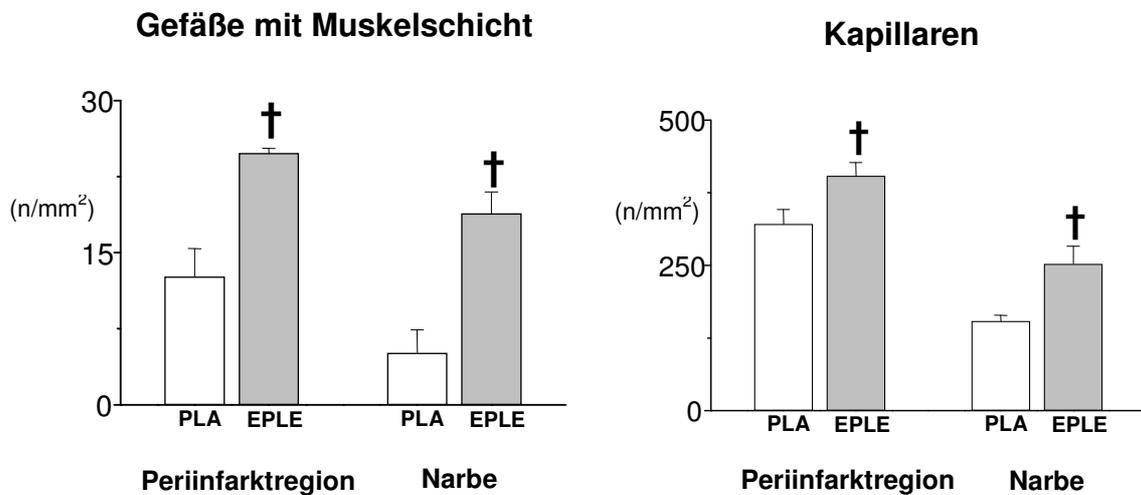
---



**Abbildung 19a:** *Neovaskularisation im heilenden Myokard* sieben Tage nach Myokardinfarkt. Die immunhistochemischen Färbungen für CD31 und  $\alpha$ -Aktin zeigen eine erhöhte Kapillardichte und eine höhere Anzahl an muskelbeschichteten Gefäßen unter sofortiger Eplerenontherapie, im Vergleich zu einer Placebobehandlung (roter Balken: 50  $\mu$ m; schwarzer Balken: 10  $\mu$ m).



**Abbildung 19b:** *Gesteigerte Neovaskularisation nach MR-Blockade*. Die doppelte immunhistochemische Färbung zeigt die mit Muskulatur ummantelten Gefäße, CD31 (braun) und  $\alpha$ -Aktin der glatten Muskulatur (grün).



**Abbildung 19c:** Anzahl muskelbeschichteter Gefäße und Kapillardichte sieben Tage nach Myokardinfarkt. Im Vergleich zur Placebobehandlung (PLA) kommt es unter sofortiger Eplerenontherapie (EPLE) zu einer deutlichen Vermehrung ummantelter Gefäße und einer erhöhten Kapillardichte in der Periinfarktregion sowie der Narbe. Mittelwerte±SEM. †p<0.05 vs. Placebo.

### 3.10 Linksventrikuläres Kollagen

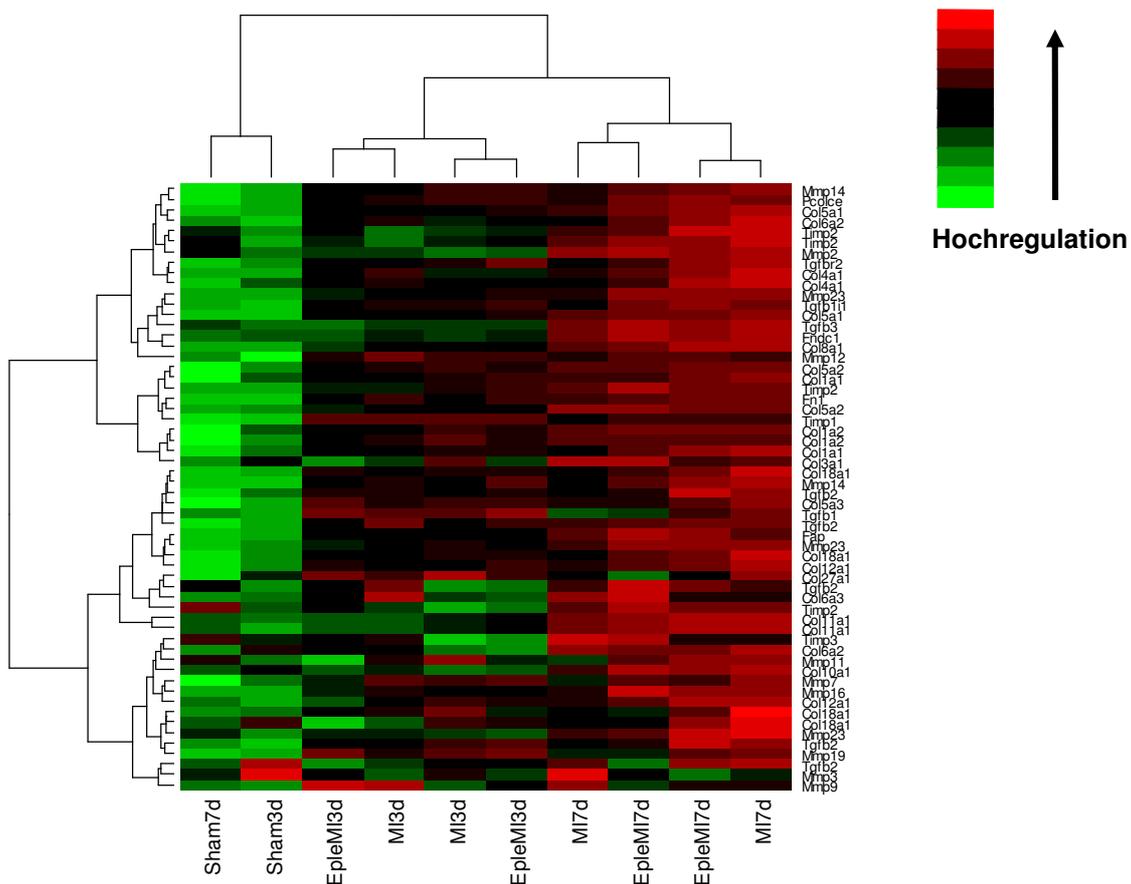
Die Mikroarray-Analyse der ganzen RNA, die drei und sieben Tage nach Myokardinfarkt aus dem gesamten infarzierten Bereich isoliert wurde, zeigte keinerlei Auswirkung einer MR-Blockade auf die Expression von Genen, die beim Kollagenumsatz beteiligt sind. Die Expression von Kollagen, TGF- $\beta$ , MMP und TIMP war schon drei Tage nach Infarkt erhöht und nach sieben Tagen noch wesentlich stärker gegenüber den scheinoperierten Tieren. Placebo- und Eplerenon-behandelte Ratten zeigten eine vergleichbare Erhöhung der Genexpression, ebenso was den Zeitverlauf betrifft (Abbildung 20a).

Genauso fand man den gleichen Kollagengehalt im Infarktgebiet von Placebo- und Eplerenon-behandelten Tieren sieben Tage nach Infarkt (Abbildung 20b).

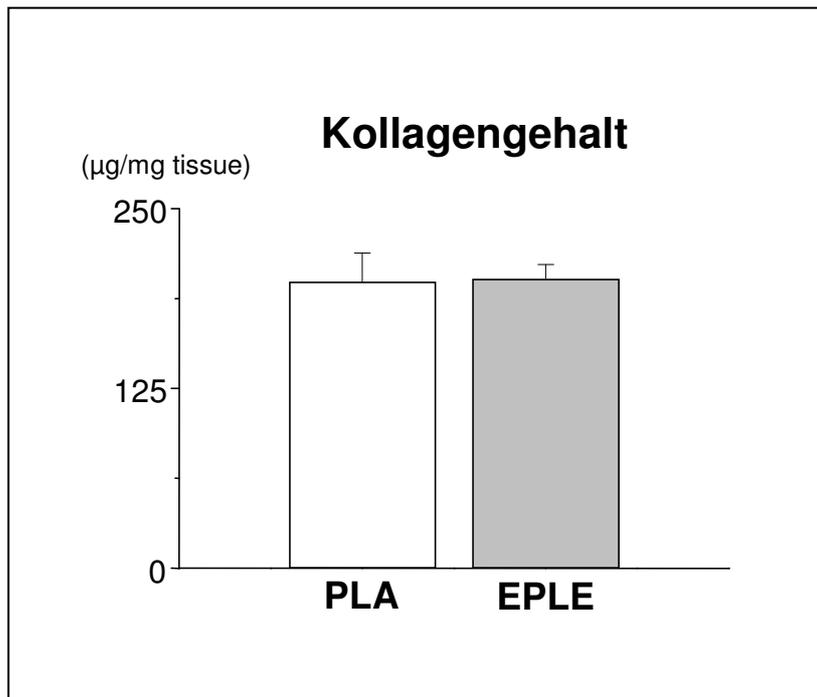
### 3. Ergebnisse

Die proteolytische Aktivität der Matrixmetalloproteinasen MMP-2 und MMP-9, sowie deren Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2 wurden mittels Zymographie und reverser Zymographie ermittelt. Was die Aktivität dieser Enzyme im Infarktgebiet sowie das Verhältnis MMP-9/TIMP-1 und MMP-2/TIMP-2 betrifft, war kein signifikanter Unterschied zwischen der Placebo- und Eplerenongruppe nach zwei, drei und sieben Tagen zu beobachten. Am siebten Behandlungstag beobachtete man ein Minimum von MMP-9/TIMP-1 und ein Maximum des Verhältnisses MMP-2/TIMP-2 (Abbildung 20c und d).

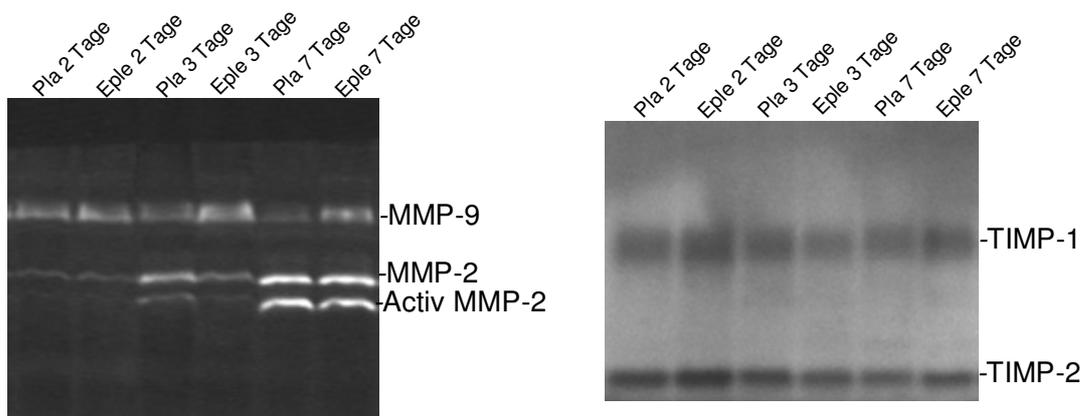
Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass eine unmittelbare Eplerenonbehandlung keinen Einfluss auf den Kollagenumsatz im Infarktgebiet hat.



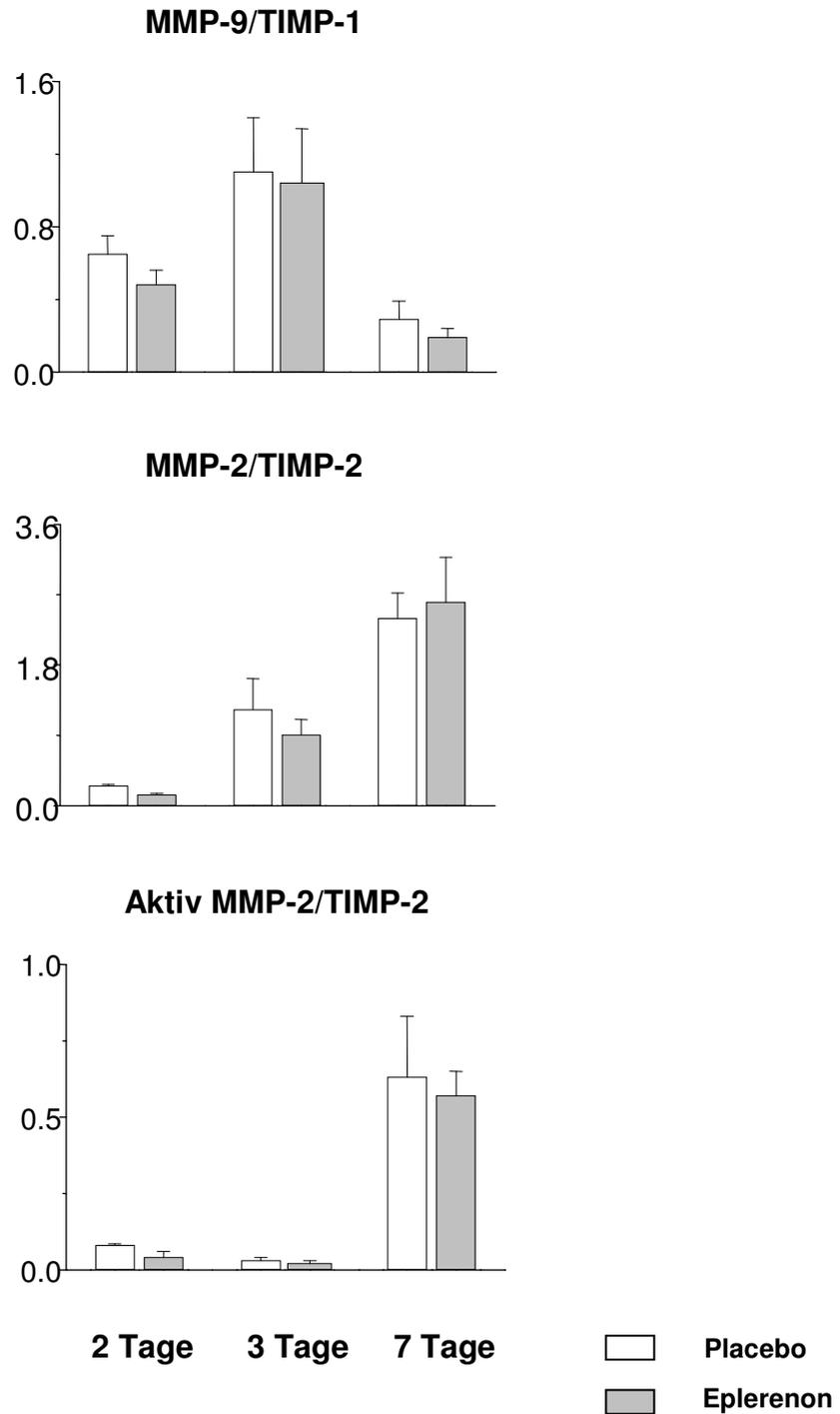
**Abbildung 20a:** *Clusteranalyse* der gesamten RNA der Infarktregion drei und sieben Tage nach Myokardinfarkt (MI). Eine sofortige Eplerenontherapie (EPLE) wirkt sich nicht auf die Expression von Genen aus, die beim Kollagenumsatz beteiligt sind. Diese ist schon nach drei Tagen gegenüber den scheinoperierten Tieren (Sham) deutlich erhöht. Placebo- und Eplerenon-behandelte Tiere waren vergleichbar in Bezug auf Genexpression und Zeitverlauf.



**Abbildung 20b: Kollagengehalt im Infarktgebiet** sieben Tage nach Myokardinfarkt. Der Kollagenanteil ist bei den herzinsuffizienten Tieren deutlich erhöht. Zwischen der Eplerenongruppe (EPL) und den Placebo-behandelten Tieren (PLA) gibt es jedoch keinen Unterschied in Bezug auf die Kollagenmenge (µg/mg Gewebe) im infarzierten Myokard. Mittelwerte±SEM.



**Abbildung 20c: Zymogramm und reverses Zymogramm** zwei, drei und sieben Tage nach Myokardinfarkt.



**Abbildung 20d: Veränderungen der MMP/TIMP-Aktivität** zwei, drei und sieben Tage nach Myokardinfarkt. Die am Gewebeumbau beteiligten Enzyme sowie deren Verhältnis waren unter Placebo- und Eplerenontherapie gleichermaßen erhöht wobei das Verhältnis MMP-9/TIMP-1 einen Höchstwert drei Tage, das Verhältnis MMP-2/TIMP-2 sieben Tage nach Infarkt aufweist. Mittelwerte±SEM.

### **4. Diskussion**

Ziel dieser Studie war es festzustellen, welche Auswirkungen eine selektive Mineralkortikoid-Rezeptorblockade mit Eplerenon, die unmittelbar nach Myokardinfarkt begonnen wurde, auf die frühe Infarktheilung und das kardiale Remodeling bei Ratten hat. Die vorliegenden Untersuchungen veranschaulichen, dass eine akute MR-Blockade nach Myokardinfarkt zu einer beschleunigten Makrophageninfiltration und einer vorübergehenden Erhöhung heilungsfördernder Zytokine und Faktor XIIIa im verletzten Myokard geführt hat. Daraus resultierte eine gesteigerte Neovaskularisation sowie eine Reduktion der frühen LV Dilatation und Dysfunktion.

#### **4.1 Tiermodell der Herzinsuffizienz**

Das in dieser Studie verwendete Tiermodell der Herzinsuffizienz bei Ratten zählt zu den am besten charakterisierten Modellen, die es erlauben, die Veränderungen und Pathomechanismen nach experimentellem Myokardinfarkt bis hin zur chronischen Herzinsuffizienz zu erforschen und aufgrund dieses Wissens neue Therapieansätze zu entwickeln (58,101). Der Myokardinfarkt führt zum Untergang von kontraktilem Gewebe innerhalb der ersten Stunden nach Koronarokklusion und resultiert in einer LV Dysfunktion, wodurch das Herz nicht mehr in der Lage ist eine adäquate Auswurfleistung zu erzielen. Im Akutstadium versucht der Organismus durch die Aktivierung neurohumoraler Systeme der kardiovaskulären Dysfunktion entgegenzuwirken. Dazu zählen unter anderem die Stimulierung des Sympathikus und des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, die durch Vasokonstriktion und Volumenretention einen Kompensationsmechanismus darstellen (45). Mit zunehmender Herzinsuffizienz kommt es zu Funktionsänderungen und ventrikelmorphologischen Umbauprozessen, dem sogenannten kardialen Remodeling. Dabei wird im Bereich der Myokardnarbe eine progrediente Ausdünnung und Expansion beobachtet, während das initial nicht betroffene vitale Myokard mit einer kompensatorischen Hypertrophie und sekundären Dilatation reagiert (4,109).

Diese für die Progression der Herzinsuffizienz verantwortlichen Prozesse sind bei Mensch und Tier sehr ähnlich und lassen sich daher gut vergleichen, weshalb dieses Modell in der medizinischen und pharmakologischen Forschung schon häufig Anwendung fand (50,101).

In die vorliegende Studie wurden nur Tiere mit einer Infarktgröße über 40% eingeschlossen, da sich erst ab diesem Umfang Zeichen einer kardialen Dysfunktion mit zunehmender Herzinsuffizienz beobachten lassen (101,110).

### **4.2 Infarktexpansion, linksventrikuläre Dilatation und Funktion**

Die Studie demonstriert, dass eine unmittelbare MR-Blockade nach Myokardinfarkt den Wundheilungsprozess beschleunigt, indem sie zu einer verminderten Infarktexpansion und einer Verbesserung der linksventrikulären Dilatation und Funktion nach sieben Tagen führt. Die progrediente Ausdünnung und Erweiterung des Infarktabschnitts ist ein Ereignis der ersten Tage nach Myokardinfarkt (109). Daher wurde mit der Eplerenonbehandlung sofort nach Koronarligatur begonnen, um einen Einfluss auf die zugrunde liegenden Parameter zu haben. Eine Dilatation und Hypertrophie des überlebenden Myokards tritt parallel zu diesem Ereignis auf und besteht über die Dauer der Infarktexpansion hinaus (109).

Die verbesserte Infarktheilung und verminderte Infarktexpansion senkt die Wandspannung und verhindert die progrediente Infarktausdehnung genauso wie den Umbau in nichtinfarzierten Bereichen des Myokards. Eine Verringerung der frühzeitigen Dilatation durch die MR-Blockade verbessert ebenso die ventrikuläre Fortleitung und vermindert lebensbedrohliche Herzrhythmusstörungen (113). Diese Mechanismen scheinen vorwiegend innerhalb der ersten drei Tage nach Infarkt wirksam zu sein, da Eplerenon die Infarktausdehnung nicht wesentlich verhindern konnte, wenn erst drei Tage nach Koronarligatur mit der Behandlung begonnen wurde.

Die Wirkungen von MR inhibierenden Therapien sind offensichtlich stark von der Wahl des richtigen Zeitpunkts, bezüglich den pathophysiologischen Stadien der Infarktheilung, abhängig. Der MR-Antagonismus verbesserte nicht die Infarkt-

ausdehnung, als er 24 Stunden nach Infarkt begonnen wurde (35). Da die höchsten Plasmaaldosteronspiegel 24 Stunden nach Myokardinfarkt beobachtet wurden, kann eine sofortige Blockade der Mineralkortikoid-Rezeptoren nach Infarkt wirkungsvoller sein. Der neueste Beweis, dass hohe Plasmaaldosteronspiegel als Auslöser eines akuten ST-Hebungsinfarkts frühzeitig und spät mit einem ungünstigen klinischen Ergebnis verbunden sind – dazu gehören Mortalität, Herzstillstand, lebensbedrohende ventrikuläre Arrhythmien und kongestive Herzinsuffizienz (13,25) – belegt diese Hypothese.

### 4.3 Hämodynamik

Nach Myokardinfarkt kommt es zu einem Anstieg des LV enddiastolischen Drucks, ein Maß für die Compliance des linken Ventrikels (73), sowie des Drucks im rechten Vorhof. Außerdem zu einer Abnahme des LV systolischen Drucks und der maximalen Druckanstiegs- bzw. Druckabfallsgeschwindigkeit (19). Diese hämodynamischen Veränderungen bestätigen auch die erhobenen Daten der vorliegenden Arbeit und deuten auf die Entwicklung einer Herzinsuffizienz hin. Durch die Therapie mit Eplerenon konnte eine deutliche Reduzierung des LVEDP sowie des RAP erreicht werden. Dieses Untersuchungsergebnis spricht für eine effektive Verbesserung der kardialen Dysfunktion durch Eplerenon gegenüber einer Placebobehandlung. Eine drei Tage nach Infarkt begonnene Behandlung hingegen reduzierte den linksventrikulären Füllungsdruck nach sieben Tagen nur geringfügig, verglichen mit Placebo. Die  $dP/dt_{\max}$  bzw.  $dP/dt_{\min}$  stellen Parameter für die Kontraktilität und Relaxationsfähigkeit des Herzens dar (93). Eplerenon führte zu einer signifikanten Zunahme beider Werte und hatte somit einen positiven Einfluss auf die linksventrikuläre Funktionsstörung. Demzufolge kam es nach einem späteren Behandlungsbeginn auch zu keiner beträchtlichen Verbesserung der frühen LV Dysfunktion gegenüber den mit Placebo behandelten Tieren.

Im Rahmen der hämodynamischen Messungen wurde auch die Druck-Volumen-Beziehung mit dem Conductance-Katheter aufgezeichnet. Diese Kurven liegen dem Frank-Starling-Mechanismus zugrunde, der durch eine günstigere diastolische

Vordehnung des Herzens eine bessere Auswurfleistung (Ejektionsfraktion) ermöglicht (152). Infolge der Herzinsuffizienz kommt es zu einer Rechtsverschiebung der Druck-Volumen-Kurven (59), was auf eine Erhöhung des linksventrikulären Volumens sowie der Vorlast zurückzuführen ist. In dieser Studie konnte nach experimentellem Myokardinfarkt eine erhebliche Zunahme des linksventrikulären endsystolischen Volumens sowie des linksventrikulären enddiastolischen Volumens mit einer Rechtsverschiebung der aufgezeichneten Kurven nachgewiesen werden, was die oben aufgeführten Beobachtungen bestätigt. Ebenso nahm aufgrund der kardialen Dysfunktion die linksventrikuläre Ejektionsfraktion um 30% ab. Unter Behandlung mit Eplerenon kam es zu einer deutlichen Verringerung des LVEDV und des LVESV, was ebenfalls für eine verbesserte systolische Herzfunktion spricht (160). Die Gabe des selektiven Aldosteronantagonisten beeinflusste auch die linksventrikuläre Auswurfleistung positiv und führte zu einer effektiven Zunahme dieses Parameters.

Diese Beobachtungen an den Studientieren belegen also, dass ein Herzinfarkt zu einer negativen Beeinflussung der Hämodynamik führt, was auf eine kardiale Dysfunktion und ein kardiales Remodeling hinweist. Durch die sofortige Gabe von Eplerenon konnten erheblich positive frühe Effekte auf die Herzfunktion erzielt werden.

### **4.4 Monozyten/Makrophagen-Aktivität und Plasmacorticosteron**

Es ist bekannt, dass Makrophagen die Infarktheilung fördern, ebenso wie die Phagozytose und den Abbau von Gewebetrümmern, die Entstehung von Granulationsgewebe und die Gefäßneubildung, und zwar durch die Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren (36,82,97,100). Die unmittelbare MR-Blockade beschleunigte deutlich die Makrophageninfiltration im infarzierten Myokard zwei Tage nach Herzinfarkt. Eine gesteigerte Makrophageneinwanderung in das Ischämiegebiet in der Akutphase, scheint ein wichtiger Mechanismus der MR-Blockade für die kardiale Wundheilung zu sein. Dahingegen war zu beobachten, dass eine verringerte Makrophagenansammlung im Infarktgebiet bis zwei Tage nach Infarkt durch die Behandlung mit liposomumkapseltem Clodronat diese vorteilhaften Effekte völlig aufhob. Um die Mechanismen zu untersuchen, die einer gesteigerten Monozyten-

ansammlung am zweiten Tag nach Infarkt zugrunde liegen, wurde der Blick auf mögliche Zusammenhänge zwischen den lokalen Reaktionen und humoralen Auswirkungen der MR-Hemmung gerichtet. *Heil et al.* bewiesen, dass die Menge an zirkulierenden Monozyten mit dem Ausmaß der Makrophagenansammlung und der Steigerung von kollateraler Gefäßbildung in ischämischen Geweben korreliert (62,63).

In der vorliegenden Studie kam es durch sofortigen MR-Antagonismus nach zwei Tagen ebenso zu einer Vermehrung der zirkulierenden Monozyten im Blut im Vergleich zu Placebo. Darüber hinaus wurden die Plasmacorticosteronspiegel gesenkt, die in umgekehrtem Verhältnis zu den Blutmonozyten standen. Es konnte gezeigt werden, dass Glukokortikoide den Entzündungsvorgang hemmen, indem sie die Anzahl der zirkulierenden und infiltrierenden Monozyten senken, was zu einer beeinträchtigten Wundheilung führt (81,111). Eine Glukokortikoidgabe hemmt den Anstieg des Chemokins MCP-1 in ischämischen Geweben (118), das für die Rekrutierung aktivierter Monozyten sorgt und verzögert die Infarktheilung, was zu einer nachteiligen linksventrikulären Dilatation führt (74,92). Desweiteren hemmen Glukokortikoide die Angiogenese im heilenden Myokard, die ebenfalls als Folge des Myokardinfarkts in Erscheinung tritt (143). Eine erhöhte Cortisolkonzentration im Blut ist mit einer schlechteren Prognose verbunden (26). Damit einhergehend konnte gezeigt werden, dass die Cortisolausschüttung bei Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz während der ersten Tage nach Infarkt am größten war (162). Somit kann die Reduktion von Plasmacorticosteron durch selektiven MR-Antagonismus zu einer Vermehrung der zirkulierenden und infiltrierenden Monozyten beigetragen haben, die zu einer Beschleunigung des Heilungsprozesses führten.

Um einen Einblick zu gewinnen durch welche Mechanismen Eplerenon die Plasmacorticosteronspiegel zwei Tage nach Myokardinfarkt senkt, wurde in weiteren Experimenten die Eplerenonwirkung bei Ratten ohne Koronarligatur untersucht. Bei dieser Tiergruppe konnten nach einer zweitägigen Eplerenonbehandlung ebenfalls verminderte Corticosteronspiegel nachgewiesen werden. Somit sind die Beobachtungen reproduzierbar, die genauen zugrunde liegenden Mechanismen dafür jedoch noch unklar.

### 4.5 Zytokin- und Faktor XIIIa-Expression im Infarktgebiet

Darüber hinaus wurden mehr infiltrierende CD4<sup>+</sup> T-Zellen im infarzierten Myokard von Eplerenon-behandelten Ratten frühzeitig nach Infarkt beobachtet. Über dieselbe Zeitspanne war die Menge an inflammatorischen und anti-inflammatorischen Zytokinen durch die Eplerenongabe wesentlich erhöht. CD4<sup>+</sup> T-Zellen tragen zu einer Monozyten/Makrophagenansammlung in der ischämischen Region bei, was wiederum die Neovaskularisation durch Zytokine und Wachstumsfaktorsekretion auslöst. Mäuse mit CD4<sup>+</sup> T-Zell-Mangel zeigten eine beeinträchtigte Makrophagenrekrutierung und ein vermindertes Wachstum von Kollateralgefäßen nach Ischämieinduktion (144).

Die akute MR-Blockade erhöhte den Anteil proinflammatorischer und anti-inflammatorischer Zytokine im verletzten Myokard nach zwei und drei Tagen, jedoch nicht nach sieben Tagen. Die Zytokinkaskade, die der myokardialen Ischämie folgt, erlaubt dem Myokard schnell auf Gewebeschäden zu reagieren und regelt die vielfältigen zellulären Vorgänge, die eine Entzündung und Heilung veranlassen (46,91,158). Eine dauerhafte Expression inflammatorischer Zytokine kann zu einer myokardialen Schädigung und einem ungünstigen linksventrikulären Umbau führen (91). Daher hat die kurzzeitige Zytokinexpression durch die MR-Blockade das Herz mit einer nützlichen anpassungsfähigen Antwort, innerhalb der ersten Tage nach Koronarligatur, auf eine Infarktschädigung ausgestattet und das ohne unerwünschte schädliche Wirkungen. Die Therapie mit dem selektiven Aldosteronantagonisten Eplerenon erhöhte vorübergehend die myokardialen Konzentrationen von MCP-1, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-6 und IL-10, die eine schützende und koordinierende Rolle für den Infarkt und die Wundheilung zu spielen scheinen. MCP-1 ist ein wichtiges chemotaktisches Zytokin, das genauso wie C5a und TGF- $\beta$ 1 die Ansammlung von Monozyten und T-Lymphozyten an den Entzündungsstellen veranlasst. Es spielt in der Stimulierung der Monozytendifferenzierung in Makrophagen eine wichtige Rolle (15). Infarzierte Mäuse mit einer Störung des MCP-1 Gens hatten eine verzögerte und verminderte Makrophageneinwanderung, einen verzögerten Ersatz beschädigter Kardiomyozyten mit Granulationsgewebe, und eine verminderte Myofibroblastenansammlung im heilenden Infarktgebiet (36). Wohingegen eine kardiale Überexpression

von MCP-1 die Makrophageninfiltration, myokardiale IL-6 Sekretion und Neovaskularisation stimulierte, wodurch eine linksventrikuläre Dysfunktion und ein Gewebeumbau nach Myokardinfarkt verhindert werden konnte (100). Auf der anderen Seite zeigten Knockout-Mäuse, bei denen die Gene für TNF- Rezeptor 1 und 2 ausgeschaltet wurden, ein wesentlich größeres Infarktausmaß, eine vermehrte Myozytenapoptose und ein verschlimmertes kardiales Remodeling nach Herzinfarkt (78). Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass eine Anti-IL-1 $\beta$ -Behandlung frühzeitig nach Infarkt zu einer schwächeren Wundheilung und verzögerten Kollagenablagerung führt (67). IL-6 ist ein pleiotropes Zytokin, das beim Wachstum und der Differenzierung von T-Lymphozyten beteiligt ist. Mäuse mit IL-6-Mangel weisen eine beeinträchtigte kutane Wundheilung auf, was darauf hindeutet, dass IL-6 für die Gewebereparatur eine wichtige Rolle zukommt (51). *Frangogiannis et al.* wiesen eine merkliche Induktion von IL-10 nach, die einer Myokardischämie folgt (47). Dieses entzündungshemmende Zytokin ist überwiegend in Lymphozyten lokalisiert, die das reperfundierte Myokard infiltrieren. Dies lässt auf eine Rolle von Lymphozyten-abstammendem IL-10 bei der Modulierung von Narbenbildung und -festigung schließen. Auf der anderen Seite führte eine genetische Defizienz von IL-10 (172) zu einer erhöhten neutrophilen Infiltration und myokardialen Nekrose nach Ischämie/Reperfusion. Schließlich kam es infolge der Eplerenontherapie zu einer vorübergehenden signifikanten Zunahme dieser Zytokine, die für eine Heilung des verletzten Myokards sorgten.

Zytokine sorgen jedoch nicht nur für das erforderliche Milieu für eine Monozyten- und T-Zell-Rekrutierung, sondern auch für deren Aktivierung im Bereich der Schädigung (106). Monozyten können sich zu klassischen oder alternativ aktivierten Makrophagen entwickeln (55). IL-4, ein anti-inflammatorisches Zytokin, induziert eine alternative Aktivierung von Makrophagen, die eine merkliche Erhöhung der Faktor XIIIa-Expression zur Folge hat (159). Nach MR-Blockade mit Eplerenon kam es zu einer Erhöhung der IL-4 Proteinspiegel und zu deutlich mehr Faktor XIIIa-positiven Makrophagen im heilenden Myokard. Die Behandlung mit liposomumkapseltem Clodronat verhinderte eine Monozyteneinwanderung in das Infarktgebiet und hob begleitend die Expression von Faktor XIIIa auf. Dies deutet darauf hin, dass Makrophagen die lokale Quelle von Faktor XIIIa darstellen. Der Gerinnungsfaktor

spielt eine wichtige pleiotrope Rolle in der Wundheilung, Gewebereparatur und Angiogenese (31,32). Die Erhöhung der Faktor XIIIa-Konzentration durch Eplerenon trägt wahrscheinlich zu einer verbesserten Infarktheilung und gesteigerten Gefäßneubildung bei. Mäuse mit Faktor XIII-Mangel leiden unter einer vermehrten Herzruptur, Infarktausdehnung, schlechteren Wundheilung und verstärktem kardialen Remodeling (102), was wiederum die Wichtigkeit von Faktor XIII in der myokardialen Infarktheilung betont.

### **4.6 Neovaskularisation im linken Ventrikel**

Eine frühzeitige Neovaskularisation nach Myokardinfarkt ist entscheidend für die Heilung und Reparatur des Herzens (40,46,75,91,158). Somit trägt eine Erhöhung des Faktors XIIIa durch die MR-Blockade voraussichtlich zu einer gesteigerten Angiogenese bei und dadurch zu einer Verbesserung der Infarktheilung.

In der vorliegenden Studie hatte eine frühzeitige MR-Blockade mit Eplerenon positive Auswirkungen auf die Gefäßneubildung. Dieser Gewinn für die Infarktheilung konnte anhand einer erhöhten Kapillardichte in der Periinfarktregion und Narbe, und einer massiven Vermehrung an großlumigen Kapillaren sieben Tage nach Myokardinfarkt belegt werden.

### **4.7 Kollagenumsatz in der Narbe**

Die Auswirkungen des Myokardinfarkts sowie einer selektiven Rezeptorblockade mit Eplerenon auf den Kollagengehalt im infarzierten Herzmuskel wurden nach sieben Tagen untersucht. Gene, die im Kollagenumsatz beteiligt sind wie Kollagen, MMP, TIMP und TGF- $\beta$  waren schon nach drei Tagen erhöht, jedoch am siebten Tag noch wesentlich weiter angestiegen. Beide Versuchsgruppen (Placebo und Eplerenon) zeigten einen vergleichbaren Anstieg und auch Zeitverlauf.

Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sind proteolytische Enzyme, die verschiedene Komponenten der Extrazellulärmatrix abbauen. Sie haben direkt oder indirekt Einfluss

auf Ionenkanäle im Endothel und der glatten Gefäßmuskulatur sowie auf andere Mechanismen der vaskulären Relaxation bzw. Kontraktion (120). Ein Umbau der Extrazellulärmatrix trägt mitunter zum Fortschreiten des linksventrikulären Remodelings bei. Eine Aktivierung von MMPs wird bei systolischer Dysfunktion beobachtet (104). Ihre Zunahme führt zu einer vermehrten Bildung von wenig strukturiertem fibrotischen Gewebe im Myokard und trägt zur Entwicklung einer fortschreitenden ventrikulären Dilatation sowie Dysfunktion bei (44). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass eine Hemmung der MMPs eine frühzeitige linksventrikuläre Dilatation in Mäusen nach Myokardinfarkt verhindern kann. Außerdem weisen infarzierte Mäuse mit einem MMP-9-Mangel eine verminderte Rate einer frühen Herzruptur (65) und Dilatation auf (37,43). Endogene Gewebeinhibitoren der Metalloproteinasen (TIMPs) sorgen für eine Verminderung der zunehmenden proteolytischen Schädigung der Extrazellulärmatrix durch MMPs. Das Gleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs spielt beim vaskulären Remodeling und der Angiogenese eine wichtige Rolle (120). In dieser Studie wurde die Aktivität von MMP-2 und MMP-9, der Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2, sowie deren Verhältnis untersucht. Die linksventrikuläre Dilatation war mit einer Zunahme des Verhältnisses MMP/TIMP assoziiert, was für eine reine Erhöhung der MMP-Aktivität spricht. Es wurde ein Ungleichgewicht zwischen den MMPs und ihren Inhibitoren nachgewiesen, das zu einer vermehrten Schädigung der Extrazellulärmatrix und einer zunehmenden Ausweitung der infarzierten Wand führen kann (43). Zwischen der Placebogruppe und den mit Eplerenon behandelten Tieren war jedoch kein signifikanter Unterschied zu beobachten.

Ein weiteres Phänomen, das zu einer kardialen Dysfunktion beitragen kann, stellt die linksventrikuläre Fibrosierung dar. Im vitalen Restmyokard nach Herzinfarkt macht sich eine zunehmende Versteifung des Ventrikels bemerkbar, die mit einer systolischen und diastolischen Funktionsstörung sowie mit kardialen Rhythmusstörungen einhergeht (18,154,165) und so zu einer Progression der Herzinsuffizienz und einem plötzlichen Herztod beiträgt (176).

Pharmakologische Untersuchungen mit Aldosteron-Rezeptorantagonisten haben bewiesen, dass Aldosteron eine herausragende Rolle für die kardiale Fibrosierung bei

Herzinsuffizienz spielt. Aldosteron stimuliert die Kollagensynthese direkt über Mineralkortikoidrezeptoren oder indirekt über eine Sensibilisierung von AT1-Rezeptoren für Angiotensin II (124,176) und verursacht eine perivaskuläre sowie interstitielle Fibrose im Myokard (2,79). Daran sind jedoch noch weitere Faktoren beteiligt wie Endothelin (3), Bradykinin (148) und Kalzium (123). *Delyani et al.* (35) demonstrierten, dass eine Aldosteron-Rezeptorblockade mit Eplerenon 24 Stunden nach Myokardinfarkt weder die reparative Kollagenablagerung in der Infarktregion beeinflusste, noch die Expansion der infarzierten Herzwand verschlechterte. Im Gegensatz dazu reduzierte eine Aldosteron-Rezeptorblockade (für vier Wochen, früh (138) oder sieben Tage (35) nach Infarkt begonnen) die reaktive Fibrosierung im überlebenden Myokard von Ratten mit moderatem Herzinfarkt. In einer Studie von *Fraccarollo et al.* (44) konnte eine Verbesserung des linksventrikulären Remodelings bei Ratten mit schwerer kardialer Dysfunktion nach ausgedehntem Herzinfarkt festgestellt werden. Dieser günstige Effekt wurde auf eine Reduktion der linksventrikulären Fibrose im nichtinfarzierten Myokard durch Eplerenon zurückgeführt. Bei Hunden mit mäßiger Herzinsuffizienz berichteten *Suzuki et al.*, dass eine Langzeit-Monotherapie mit Eplerenon die interstitielle Fibrosierung und Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen verringerte und die ventrikuläre Funktion verbesserte (151). So dürften die nützlichen Wirkungen auf die isovolumentrische Relaxation teilweise auf einer Verminderung der Kollagenablagerung im überlebenden Myokard der linken Herzkammer und der Kollagen Typ I mRNA Expression beruhen.

Hier soll angemerkt werden, dass die Untersuchungsergebnisse dieser Studie nicht im Gegensatz zu den bisher beschriebenen anti-inflammatorischen Wirkungen einer langfristigen MR-blockierenden Therapie stehen. Es wird nicht ausgeschlossen, dass Aldosteron eine bedeutende Rolle bei der vaskulären sowie myokardialen Entzündungsentstehung über proinflammatorische Zytokine spielt (127). Darüber hinaus sollte beachtet werden, dass eine Langzeit-MR-Blockade die Expression von Zytoskelettproteinen sowie Matrix-Metalloproteinasen normalisiert und eine fortschreitende linksventrikuläre Dysfunktion genauso wie ein Remodeling bei experimentell hervorgerufener Herzinsuffizienz verhindert (44,151). Unsere Studie zeigt auf, dass die akute MR-Blockade eine inflammatorische Zellinfiltration

beschleunigte und eine kurzzeitige Erhöhung heilungsfördernder Zytokine im verletzten Myokard frühzeitig nach Infarkt hervorrief. Dies führte zu einer gesteigerten Faktor XIIIa-Expression und zu einer Verbesserung der Neovaskularisation sowie Infarktexpansion.

### 4.8 Klinische Studien

Die Auswirkungen einer MR-Blockade auf die Pathomechnismen der Herzinsuffizienz, besonders des kardialen Remodelings wurden in verschiedenen Studien an Mensch und Tier untersucht. Zwei große klinische Studien bei Herzinsuffizienz-Patienten haben gezeigt, dass die MR-Antagonisten Spironolacton und Eplerenon zusätzlich zu ACE-Hemmern die Morbidität und Mortalität verbessern (115,117). Vor allem wurde eine Reduktion des plötzlichen Herztods beobachtet. Der Mechanismus, der für diesen positiven Effekt verantwortlich ist, wurde noch nicht vollständig geklärt. Er dürfte mit Veränderungen der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> Homöostase und/oder einer Hemmung der myokardialen Fibrose verbunden sein. Kürzlich wurde nachgewiesen, dass eine Überexpression von MR's im Herz von Mäusen schwere Herzrhythmusstörungen zur Folge hat, die durch eine Rezeptorblockade vermindert werden konnten (107). Die Hemmung von Aldosteron fand vermehrte Anwendung bei Patienten mit einer schweren Herzinsuffizienz aufgrund systolischer linksventrikulärer Dysfunktion. Dieser Nutzen basierte auf den Ergebnissen der RALES-Studie (Randomized ALdactone Evaluation Study). Die Rolle einer Aldosteronblockade bei Patienten mit akutem Herzinfarkt wurde durch die EPHEBUS-Studie (Eplerenone Post acute myocardial infarction Heart failure Efficacy and SURvival Study) eindeutig herausgestellt. Beide Studien offenbarten eine signifikante Reduktion der Mortalität, des Hospitalisierungsrisikos und der Entstehung kardiovaskulärer Ereignisse durch eine Kombinationstherapie aus Spironolacton bzw. Eplerenon und einem ACE-Hemmer oder AT<sub>1</sub>-Rezeptorblocker.

In der **RALES-Studie** reduzierte die zusätzliche Behandlung mit Spironolacton bei Patienten mit NYHA-Klasse III oder IV, die schon mit einem ACE-Hemmer, Diuretika und Digoxin therapiert wurden, die Mortalitätsrate um 30%. Außerdem konnte eine signifikante Verringerung der Hospitalisierung von 35% erreicht werden (117).

Spironolacton könnte auch durch eine Erhöhung des Serumkaliumspiegels oder eine Veränderung der myokardialen Norepinephrin-Aufnahme den plötzlichen Herztod verhindert haben (9). Eine weitere Studie demonstrierte, dass die Zusatztherapie mit Spironolacton zu einer Verringerung ventrikulärer Arrhythmien bei Patienten mit kongestiver Herzinsuffizienz führt (122). Eine Substudie von RALES weist auf eine mögliche Verbindung zwischen den anti-fibrotischen Wirkungen des Medikaments und der Mortalitätsreduktion hin (175). Erhöhte Serummarker für die kardiale Kollagensynthese waren mit einem schlechten Ergebnis bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz assoziiert, die jedoch durch eine Spironolactontherapie vermindert werden konnten.

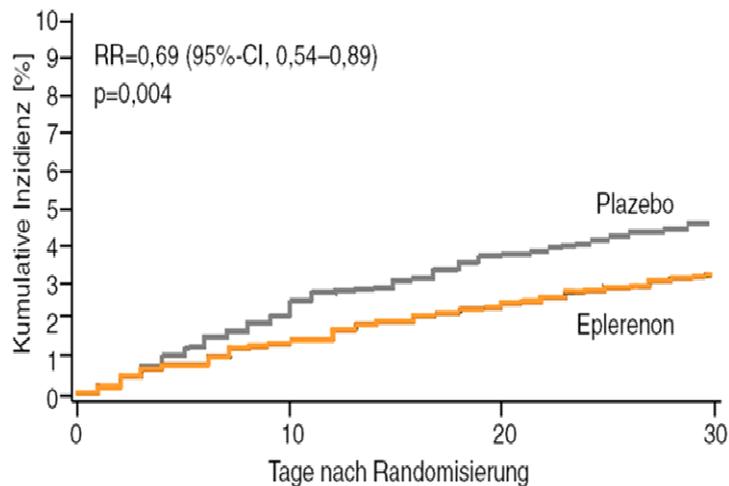
*Hayashi et al.* (61) konnten zeigen, dass ein früher Mineralkortikoid-Antagonismus direkt nach Revaskularisierung sinnvoll ist. Patienten mit Herzinfarkt, die unmittelbar nach Koronarreperfusion einen Monat lang mit Spironolacton behandelt wurden, zeigten eine signifikante Verbesserung des linksventrikulären Remodelings. Die Ejektionsfraktion des linken Ventrikels wurde verbessert und das enddiastolische Volumen ebenso wie die myokardiale Kollagenbildung reduziert. Da Spironolacton jedoch abgesehen von Mineralkortikoid-Rezeptor blockenden Eigenschaften auch eine erhöhte Affinität zu Androgen- und Progesteronrezeptoren aufweist, kommt es unter Behandlung zu einem Häufigkeitsanstieg von Gynäkomastie, Brustschmerzen oder Impotenz bei Männern bzw. Menstruationsbeschwerden bei Frauen.

Auch in der **EPHESUS-Studie** (115) erzielten die Patienten, die der Behandlung frühzeitig zugeführt wurden (3-7 Tage), einen größeren Gewinn als diejenigen, die später randomisiert wurden (7-14 Tage). Bei diesen Untersuchungen wurden über 6.600 Patienten mit akutem Herzinfarkt und systolischer linksventrikulärer Dysfunktion (Ejektionsfraktion  $\leq 40\%$ ) mit dem selektiven Aldosteronblocker Eplerenon behandelt, zusammen mit einer Standardtherapie aus koronarer Reperfusion, Aspirin, Statinen,  $\beta$ -Blocker und ACE-Hemmer oder AT<sub>1</sub>-Rezeptorblocker. Dies führte zu einer 15%-igen Gesamt-Mortalitätssenkung ( $p=0.008$ ) und einer Reduktion der kardiovaskulären Mortalität um 17% ( $p=0.005$ ), die hauptsächlich einer 21%-igen Abnahme des plötzlichen Herztods ( $p=0.03$ ) zu verdanken waren. In einer Folgeanalyse konnte 30

## 4. Diskussion

---

Tage nach Infarkt sogar eine Reduktion der Mortalität um 31% ( $p=0.004$ ) bzw. der kardiovaskulären Mortalität um 32% ( $p=0.003$ ) erzielt werden (116) (Abbildung 21).



**Abbildung 21: EPHEBUS-Studie, 30-Tages-Mortalität.** Eplerenon senkt die Mortalitätsrate 30 Tage nach Randomisierung bei Patienten mit kardialer Dysfunktion und Herzinsuffizienz nach akutem Myokardinfarkt. Nach Pitt et al. (116).

Diese positiven Auswirkungen durch eine Aldosteronblockade machten sich relativ früh bemerkbar und hielten über die gesamte Behandlungsperiode von 16 Monaten an. Im Gegensatz zur vorherigen Erfahrung unter Anwendung des nichtselektiven MR-Blockers Spironolacton, gab es hier keinen Anstieg in der Inzidenz von Sexualhormonvermittelten ungünstigen Effekten. Jedoch wurden auch nachteilige Nebenwirkungen beschrieben, die mit einer Eplerenonbehandlung einhergehen. Darunter ist vor allem eine ernste Hyperkaliämie ( $\geq 6$  mmol/l) zu nennen, die in der RALES-Population mit 1% vs. 2% (117) und in der EPHEBUS-Population mit 3.9% vs. 5.5% (115) wesentlich häufiger auftrat. Dahingegen wurde eine starke Verringerung von ernsten Hypokaliämien (13.1% vs. 8.4%) bei EPHEBUS beobachtet, die ein ebenso großes oder möglicherweise noch ein größeres Risiko bei Herzinsuffizienz-Patienten darstellen

können als Hyperkaliämien. Aus epidemiologischen Daten und biologischen Studien geht hervor, dass eine positive Kaliumbilanz viel seltener die Ursache eines Herzstillstands darstellt als eine Kaliumarmut (80). Da die Inzidenz einer schweren Hyperkaliämie dosisabhängig ist, kann eine überwachte Medikamentengabe zu einer Häufigkeitsreduktion führen. Bei Patienten die unter einer Niereninsuffizienz (Kreatinin-Clearance  $\leq 30$  ml/min) leiden, sollte Eplerenon vermieden werden (23).

Die Ergebnisse der EPHEBUS-Studie (115,116) und der Studie von *Hayashi et al.* (61) machen die frühzeitig nützlichen Effekte einer Aldosteronblockade auf das frühe ventrikuläre Remodeling deutlich. Sie legen nahe, dass dies eine wichtige Ergänzung zur derzeitigen Therapie von Patienten mit akutem Myokardinfarkt sein wird. Natürlich muss das Risiko bzw. der Nutzen eines frühen (Tag 1) Aldosteronantagonismus bei Patienten nach Infarkt in weiteren prospektiven randomisierten Studien untersucht werden.

Weitere Studien werden ebenso nötig sein um zu untersuchen, ob die Aldosteronblockade auf Patienten mit frühen Anzeichen einer systolischen linksventrikulären Dysfunktion beschränkt sein sollte oder wie ACE-Hemmer und  $\beta$ -Blocker bei allen Patienten mit Myokardinfarkt angewendet werden kann, ungeachtet der Auswurfleistung des linken Ventrikels (113). Die Tatsache, dass die mittlere Ejektionsfraktion in der Studie von *Hayashi et al.* (61) 46% betrug macht deutlich, dass eine schwere systolische Dysfunktion für eine nutzbringende Aldosteronblockade nicht notwendig ist. Sie sollte ebenso ungeachtet einer Reperfusion in Betracht gezogen werden, da in der EPHEBUS-Studie (115) sowohl Patienten mit als auch ohne durchblutungsfördernde Maßnahmen von der Behandlung profitierten. Die Frage, ob es einen Vorteil von Eplerenon im Vergleich zu Spironolacton gibt, ist ebenso ein wichtiger Gesichtspunkt. Sollte eine verlängerte Medikamentengabe die Aufrechterhaltung der positiven Aldosteron-blockierenden Effekte auf das ventrikuläre Remodeling und folglich auf die Morbidität bzw. Mortalität beweisen, würde aufgrund der Abwesenheit von Nebenwirkungen (wie Gynäkomastie, Brustschmerzen, Menstruationsbeschwerden) die selektive Aldosteronblockade mit Eplerenon favorisiert werden (113). Ebenso könnte, durch die längere Halbwertszeit von Spironolacton, eine

höhere Inzidenz von Hyperkaliämien im Vergleich zu Eplerenon auftreten. Bei der diabetischen Nephropathie sorgt Eplerenon auch für den Schutz der Niere durch eine Senkung der Proteinurie. *Epstein et al.* (39) untersuchten die Auswirkungen einer selektiven Aldosteronblockade auf die Eiweißausscheidung bei Patienten mit Typ-2 Diabetes mellitus und Hypertonie. Nach einem halben Jahr wurde die Proteinurie um 62% durch eine Eplerenon-Monotherapie gesenkt. Eplerenon spielt darüber hinaus eine wichtige Rolle bei der Behandlung der essentiellen Hypertonie. *Weinberger et al.* (167) bewiesen die Wirksamkeit und Sicherheit des selektiven Aldosteronantagonisten, der für eine signifikante Senkung des Blutdrucks sorgte. Auch in einer weiteren Studie von *Krum et al.* (77) wurde dieser positive Effekt unter zusätzlicher Gabe von ACE-Hemmern oder AT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten ersichtlich. Bei den Untersuchungen von *White et al.* (171) scheint Eplerenon vergleichbar mit dem Kalziumantagonisten Amlodipin zu sein, was die Reduktion des systolischen Blutdrucks betrifft. Schließlich wurde auch in der **4E-Studie** (Eplerenon, Enalapril und Eplerenon/Enalapril-Kombination) nachgewiesen, dass Eplerenon genauso effektiv ist wie der ACE-Hemmer Enalapril was den Rückgang einer linksventrikulären Hypertrophie und den systolischen sowie diastolischen Blutdruck betrifft, wobei eine Kombinationstherapie eine additive Wirkung zeigte (114). Bisher ist der selektive Aldosteronantagonist Eplerenon jedoch nur in den USA für die Behandlung der essentiellen Hypertonie zugelassen. Aufgrund der vielen Nachweise einer günstigen Blutdrucksenkung sollte die Überlegung gemacht werden, ob Eplerenon auch hierzulande nicht nur für die Therapie einer Herzinsuffizienz sondern auch bei der Hypertoniebehandlung eingesetzt werden sollte. Es gab noch keine konkreten Studien dahingehend, wie lange eine Aldosteronblockade nach Infarkt fortgesetzt werden sollte. *Pitt et al.* haben angegeben, dass es akzeptabel wäre die Medikamentengabe zu beenden sobald die Ejektionsfraktion 40% erreicht und Krankheitsanzeichen verschwinden (114). Es gibt offensichtlich noch viele Fragen, die durch weitere klinische Untersuchungen beantwortet werden müssen, bevor wir den vollen Nutzen aus einer MR-Blockade für Patienten mit akutem Myokardinfarkt ziehen können.

Die vorliegende Studie zeigt, dass die sofortige Behandlung mit einem MR-Blocker nach Myokardinfarkt den Heilungsprozess verbessert und die Extension und Dilatation des ischämischen Myokardareals reduziert. Die Auswirkung einer Aldosteron-blockierenden Therapie auf die Infarktexpansion kann teilweise die Wirksamkeit von Eplerenon auf die Mortalität 30 Tage nach Randomisierung bei Patienten nach akutem Myokardinfarkt erklären (116). Eine fortschreitende Ausdünnung und Erweiterung des Infarktabschnitts (Infarktexpansion) sind Ereignisse, die sich in den ersten Tagen nach Myokardinfarkt abspielen. Eine Verbesserung der Narbendicke verringert die Wandspannung und verhindert die Infarktexpansion ebenso wie das Remodeling in nichtinfarzierten Bereichen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass Eplerenon die frühe Entzündungsphase nach Infarkt positiv moduliert, indem der Aldosteronantagonist die Infarktwundheilung beschleunigt, die Neovaskularisation anregt und zu einer wirkungsvollen Verminderung der Infarktexpansion und frühzeitigen linksventrikulären Dilatation führt. Somit kann eine unmittelbare selektive MR-Blockade bei Patienten mit Myokardinfarkt, neben der Verbesserung des chronischen linksventrikulären Remodelings, erheblich günstige Auswirkungen haben und sollte in entsprechenden klinischen Studien evaluiert werden.

## **5. Zusammenfassung**

Die Pathophysiologie der Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt ist bestimmt durch neurohumorale Aktivierung und durch Umbauprozesse sowohl in der Infarktregion als auch im überlebenden Myokard, dem sog. linksventrikulären (LV) Remodeling. Eine fortschreitende Ausdünnung und Vergrößerung des Infarktareals (Infarktexpansion) findet in den ersten Tagen nach Myokardinfarkt statt. Eine Verbesserung der Narbendicke vermindert die Wandspannung und verhindert die Infarktexpansion, genauso wie das Remodeling in nichtinfarzierten Bereichen. Schon mehrfach wurde beschrieben, dass sich eine Hemmung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems positiv auf das LV Remodeling auswirkt. In der EPHEBUS-Studie (Eplerenone Post acute myocardial infarction Heart failure Efficacy and SURvival Study) führte eine Mineralkortikoidrezeptor (MR)-Blockade mit Eplerenon, die zwischen dem 3. und 14. Tag nach Infarkt zusätzlich zur optimalen Standardtherapie begonnen wurde, bereits 30 Tage nach Therapiebeginn zu einer Mortalitätssenkung von 30%.

In der vorliegenden Studie wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine MR-Blockade in der Akutphase nach Infarkt die Heilung des infarzierten Myokards begünstigt. Ziel dieser Untersuchungen war es herauszufinden, ob eine sofortige MR-Blockade nach experimentellem Myokardinfarkt günstige Auswirkungen auf Hämodynamik, Infarktexpansion und Neovaskularisation zeigt, mit Betonung auf zugrunde liegenden zellulären und molekularen Ereignissen.

Dazu wurden männliche Wistar-Ratten sofort nach experimenteller Infarzierung durch Koronarligatur oder Scheinoperation (Sham) mit dem selektiven MR-Antagonisten Eplerenon (100 mg/kg/d) oder Placebo für zwei bis sieben Tage behandelt. Nach Ablauf der Behandlungsdauer wurden hämodynamische Messungen durchgeführt und anschließend Blutproben sowie das Herz für weitere Untersuchungen entnommen. Nach Myokardinfarkt fanden sich Zeichen einer ausgeprägten LV Dysfunktion und Veränderungen der Ventrikelmorphologie.

Nach sieben Tagen Eplerenontherapie konnte, im Vergleich zur Placebogruppe, eine erheblich reduzierte Ausdünnung und Dilatation der infarzierten Wand, eine verbesserte LV Funktion und eine gesteigerte Gefäßneubildung im verletzten Myokard beobachtet werden. Der MR-Antagonismus beschleunigte die Infiltration von Monozyten im infarzierten Myokard, verbunden mit einem erhöhten Spiegel von Monocyte Chemoattractant Protein-1 sowie einem niedrigeren Plasmacorticosteronspiegel zwei Tage nach Infarkt. Darüber hinaus führte die MR-Blockade zu einer vorübergehenden Zunahme von Zytokinen am zweiten und dritten Tag und einer Erhöhung der Proteinexpression von Faktor XIIIa im heilenden Myokard. Die immunhistochemische Färbung zeigte mehr Faktor XIIIa-positive Makrophagen nach MR-Hemmung, die bei der Infarktheilung eine wichtige Rolle spielen. Eine Verhinderung der Makrophageninfiltration in die Infarktzone durch Behandlung mit Liposom-verkapseltem Clodronat hob die Faktor XIIIa-Expression und die nützlichen Wirkungen von Eplerenon auf die Infarktexpansion und frühe LV Dilatation nahezu auf.

Diese Ergebnisse zeigen, dass sich eine MR-Blockade mit Eplerenon unmittelbar nach Myokardinfarkt sehr positiv auf die frühe Heilungsantwort im verletzten Myokard auswirkt. Dieser Benefit wird durch eine beschleunigte Makrophageninfiltration und eine vorübergehend erhöhte Expression heilungsfördernder Zytokine und Faktor XIIIa im infarzierten Myokard erreicht. Dies führt zu einer gesteigerten Neovaskularisation sowie zu einer Reduktion der frühen LV Dilatation und Dysfunktion.

## **6. Literaturverzeichnis**

1. **Adams KF Jr.** (2004)  
Pathophysiologic role of the renin-angiotensin-aldosterone and sympathetic nervous systems in heart failure.  
*Am J Health Syst Pharm* 61:S4-13
2. **Alil JE, Doering CW, Janicki JS, Pick R, Shroff SG, Weber KT.** (1989)  
Fibrillar collagen and myocardial stiffness in the intact hypertrophied rat left ventricle.  
*Circ Res* 64:1041-1050
3. **Ammarguella F, Larouche II, Schiffrin EL.** (2001)  
Myocardial fibrosis in DOCA-salt hypertensive rats: effect of endothelin ET(A) receptor antagonism.  
*Circulation* 103:319-324
4. **Anversa P, Sonnenblick EH.** (1990)  
Ischemic cardiomyopathy: pathophysiologic mechanisms.  
*Prog Cardiovasc Dis* 33:49-70
5. **Armstrong PW.** (2000)  
Left ventricular dysfunction: causes, natural history, and hopes for reversal.  
*Heart* 84:115-17
6. **Arriza JL, Weinberger C, Cerelli G, Glaser TM, Handelin BL, Housman DE, Evans RM.** (1987)  
Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor.  
*Science* 237:268-275
7. **Auer J, Berent R, Eber B.** (2001)  
Pathophysiology and therapeutic aspects of left ventricular “remodeling“ in the post-infarct phase.  
*Acta Med Austriaca* 28:117-122
8. **Baan J, van der Velde ET, de Bruin HG, Smeenk GJ, Koops J, van Dijk AD, Temmerman D, Senden J, Buis B.** (1984)  
Continuous measurement of left ventricular volume in animals and humans by conductance catheter.  
*Circulation* 70:812-823
9. **Barr CS, Lang CC, Hanson J, Arnott M, Kennedy N, Struthers AD.** (1995)  
Effects of adding spironolactone to an angiotensin-converting enzyme inhibitor in chronic congestive heart failure secondary to coronary artery disease.  
*Am J Cardiol* 76:1259-1265

10. **Bauersachs J.** (2004)  
Aldosterone antagonism in heart failure: improvement of cardiac remodelling, endothelial dysfunction and platelet activation.  
*Eur J Clin Invest* 34:649-652
11. **Bauersachs J, Heck M, Fraccarollo D, Hildemann SK, Ertl G, Wehling M, Christ M.** (2002)  
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* 39:351-358
12. **Beltrami CA, Finato N, Rocco M, Feruglio GA, Puricelli C, Cigola E, Quaini F, Sonnenblick EH, Olivetti G, Anversa P.** (1994)  
Structural basis of end-stage failure in ischemic cardiomyopathy in humans.  
*Circulation* 89:151-163
13. **Beygui F, Collet JP, Benoliel JJ, Vignolles N, Dumaine R, Barthelemy O, Montalescot G.** (2006)  
High plasma aldosterone levels on admission are associated with death in patients presenting with acute ST-elevation myocardial infarction.  
*Circulation* 114:2604-2610
14. **Bhargava A, Fullerton MJ, Myles K, Purdy TM, Funder JW, Pearce D, Cole TJ.** (2001)  
The serum- and glucocorticoid-induced kinase is a physiological mediator of aldosterone action.  
*Endocrinology* 142:1587-1594
15. **Birdsall HH, Green DM, Trial J, Youker KA, Burns AR, MacKay CR, LaRosa GJ, Hawkins HK, Smith CW, Michael LH, Entman ML, Rossen RD.** (1997)  
Complement C5a, TGFbeta 1, and MCP-1, in sequence, induce migration of monocytes into ischemic canine myocardium within the first one to five hours after reperfusion.  
*Circulation* 95:684-692
16. **Booth RE, Johnson JP, Stockand JD.** (2002)  
Aldosterone  
*Advan Physiol Edu* 26:8-20
17. **Bradham WS, Bozkurt B, Gunasinghe H, Mann D, Spinale FG.** (2002)  
Tumor necrosis factor-alpha and myocardial remodeling in progression of heart failure: a current perspective.  
*Cardiovasc Res* 53:822-830

18. **Braunwald E, Bristow MR.** (2000)  
Congestive heart failure: fifty years of progress.  
*Circulation* 102: IV14-23
19. **Braunwald E, Zipes DP, Libby P.** (2001)  
Heart Disease  
*6th Edition, WB:Saunders Company 2001*
20. **Brilla CG, Matsubara LS, Weber KT.** (1993)  
Anti-aldosterone treatment and the prevention of myocardial fibrosis in primary and secondary hyperaldosteronism.  
*J Mol Cell Cardiol* 25:563-575
21. **Brilla CG, Pick R, Tan LB, Janicki JS, Weber KT.** (1990)  
Remodeling of the rat right and left ventricles in experimental hypertension.  
*Circ Res* 67:1355-1364
22. **Brilla CG, Rupp H, Funck R, Maisch B.** (1995)  
The renin-angiotensin-aldosterone system and myocardial collagen matrix remodelling in congestive heart failure.  
*Eur Heart J* 16:O107-109
23. **Brown NJ.** (2003)  
Eplerenone: cardiovascular protection.  
*Circulation* 107:2512-2518
24. **Brown NJ, Kim KS, Chen YQ, Blevins LS, Nadeau JH, Meranze SG, Vaughan DE.** (2000)  
Synergistic effect of adrenal steroids and angiotensin II on plasminogen activator inhibitor-1 production.  
*J Clin Endocrinol Metab* 85:336-344
25. **Calhoun DA.** (2006)  
Aldosterone and cardiovascular disease: smoke and fire.  
*Circulation* 114:2572-2574
26. **Ceremuzynski L.** (1981)  
Hormonal and metabolic reactions evoked by acute myocardial infarction.  
*Circ Res* 48:767-776
27. **Cohn JN, Anand IS, Latini R, Masson S, Chiang YT, Glazer R; Valsartan Heart Failure Trial Investigators.** (2003)  
Sustained reduction of aldosterone in response to the angiotensin receptor blocker valsartan in patients with chronic heart failure: results from the Valsartan Heart Failure Trial.  
*Circulation* 108:1306-1309

28. **Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N.** (2000)  
Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling.  
*J Am Coll Cardiol* 35:569-582
29. **Cowie MR, Wood DA, Coats AJS, Thompson SG, Poole-Wilson PA, Suresh V, Sutton GC.** (1999)  
Incidence and aetiology of heart failure. A population based study.  
*Eur Heart J* 20:421-428
30. **Creemers EE, Cleutjens JP, Smits JF, Daemen MJ.** (2001)  
Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure?  
*Circ Res* 89:201-210
31. **Dardik R, Loscalzo J, Eskaraev R, Inbal A.** (2005)  
Molecular mechanisms underlying the proangiogenic effect of factor XIII.  
*Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:526-532
32. **Dardik R, Loscalzo J, Inbal A.** (2006)  
Factor XIII (FXIII) and angiogenesis.  
*J Thromb Haemost* 4:19-25
33. **Delcayre C, Silvestre JS, Garnier A, Oubenaissa A, Cailmail S, Tatara E, Swynghedauw B, Robert V.** (2000)  
Cardiac aldosterone production and ventricular remodeling.  
*Kidney Int* 57:1346-1351
34. **Delcayre C, Swynghedauw B.** (2002)  
Molecular mechanisms of myocardial remodeling. The role of aldosterone.  
*J Mol Cell Cardiol* 34:1577-1584
35. **Delyani JA, Robinson EL, Rudolph AE.** (2001)  
Effect of a selective aldosterone receptor antagonist in myocardial infarction.  
*Am J Physiol* 281:H647-654
36. **Dewald O, Zymek P, Winkelmann K, Koerting A, Ren G, Abou-Khamis T, Michael LH, Rollins BJ, Entman ML, Frangogiannis NG.** (2005)  
CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts.  
*Circ Res* 96:881-889
37. **Ducharme A, Frantz S, Aikawa M, Rabkin E, Lindsey M, Rohde LE, Schoen FJ, Kelly RA, Werb Z, Libby P, Lee RT.** (2000)  
Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction.  
*J Clin Invest* 106:55-62

- 38. Duchman SM, Thohan V, Kalra D, Torre-Amione G. (2000)**  
Endothelin-1: a new target of therapeutic intervention for the treatment of heart failure.  
*Curr Opin Cardiol* 15:136-140
- 39. Epstein M, Buckalew V, Martinez F, et al. (2002)**  
Antiproteinuric efficacy of eplerenone, enalapril, and eplerenone/enalapril combination in diabetic hypertensives with microalbuminuria.  
*Am J Hypertens* 15:A24
- 40. Ertl G, Frantz S. (2005)**  
Healing after myocardial infarction.  
*Cardiovasc Res* 66:22-32
- 41. Espiner E, Nichols M. (2002)**  
In *The Renin-Angiotensin System*  
Gower Medical Publishing: London pp.33.1-33.24
- 42. Fraccarollo D, Bauersachs J, Kellner M, Galuppo P, Ertl G. (2002)**  
Cardioprotection by long-term ET(A) receptor blockade and ACE inhibition in rats with congestive heart failure: mono- versus combination therapy.  
*Cardiovasc Res* 54:85-94
- 43. Fraccarollo D, Galuppo P, Bauersachs J, Ertl G. (2002)**  
Collagen accumulation after myocardial infarction: effects of ETA receptor blockade and implications for early remodeling.  
*Cardiovasc Res* 54:559-567
- 44. Fraccarollo D, Galuppo P, Hildemann S, Christ M, Ertl G, Bauersachs J. (2003)**  
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* 42:1666-1673
- 45. Francis GS. (1985)**  
Neurohumoral mechanisms involved in congestive heart failure.  
*Am J Cardiol* 55:A15-21
- 46. Frangogiannis NG. (2006)**  
Targeting the inflammatory response in healing myocardial infarcts.  
*Curr Med Chem* 13:1877-1893
- 47. Frangogiannis NG, Mendoza LH, Lindsey ML, Ballantyne CM, Michael LH, Smith CW, Entman ML. (2000)**  
IL-10 is induced in the reperfused myocardium and may modulate the reaction to injury.  
*J Immunol* 165:2798-2808

48. **Funder JW.** (1995)  
Mineralocorticoid receptors and hypertension.  
*J Steroid Biochem Mol Biol* 53:53-55
49. **Funder JW.** (2005a)  
The nongenomic actions of aldosterone.  
*Endocr Rev* 26:313–321
50. **Gaballa MA, Goldman S.** (2002)  
Ventricular remodeling in heart failure.  
*J Card Fail* 8:S476-485
51. **Gallucci RM, Simeonova PP, Matheson JM, Kommineni C, Guriel JL, Sugawara T, Luster MI.** (2000)  
Impaired cutaneous wound healing in interleukin-6-deficient and immunosuppressed mice.  
*Faseb J* 14:2525-2531
52. **Garg S, Narula J, Chandrashekar Y.** (2005)  
Apoptosis and heart failure: clinical relevance and therapeutic target.  
*J Mol Cell Cardiol* 38:73–79
53. **Gerdes AM.** (2002)  
Cardiac myocyte remodeling in hypertrophy and progression to failure.  
*J Card Fail* 8:S264-268
54. **Gomez-Sanchez EP, Venkataraman MT, Thwaites D, Fort C.** (1990)  
ICV infusion of corticosterone antagonizes ICV-aldosterone hypertension.  
*Am J Physiol* 258:E649-653
55. **Gordon S.** (2003)  
Alternative activation of macrophages.  
*Nat Rev Immunol* 3:23-35
56. **Gottlieb SS, McCarter RJ, Vogel RA.** (1998)  
Effect of beta-blockade on mortality among high-risk and low-risk patients after myocardial infarction.  
*N Engl J Med* 339:489-497
57. **Guyatt GH, Devereaux PJ.** (2004)  
A review of heart failure treatment.  
*Mt Sinai J Med* 71:47-54
58. **Hasenfuss G.** (1998)  
Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy.  
*Cardiovasc Res* 39:60-76

- 59. Hasnat AK, van der Velde ET, Hon JK, Yacoub MH. (2003)**  
Reproducible model of post-infarction left ventricular dysfunction: haemodynamic characterization by conductance catheter.  
*Eur J Cardiothorac Surg* 24:98-104
- 60. Hatakeyama H, Miyamori I, Fujita T, Takeda Y, Takeda R, Yamamoto H. (1994)**  
Vascular aldosterone. Biosynthesis and a link to angiotensin II-induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells.  
*J Biol Chem* 269:24316-24320
- 61. 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. (2003)**  
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* 107:2559-2565
- 62. Heil M, Schaper W. (2004)**  
Influence of mechanical, cellular, and molecular factors on collateral artery growth (arteriogenesis).  
*Circ Res* 95:449-458
- 63. Heil M, Ziegelhoeffer T, Pipp F, Kostin S, Martin S, Clauss M, Schaper W. (2002)**  
Blood monocyte concentration is critical for enhancement of collateral artery growth.  
*Am J Physiol* 283:H2411-2419
- 64. Hene RJ, Boer P, Koomans HA, Dorhout Mees EJ. (1982)**  
Plasma aldosterone concentrations in chronic renal disease.  
*Kidney Int* 21:98-101
- 65. Heymans S, Luttun A, Nuyens D, Theilmeier G, Creemers E, Moons L, Dyspersin GD, Cleutjens JP, Shipley M, Angellilo A, Levi M, Nübe O, Baker A, Keshet E, Lupu F, Herbert JM, Smits JF, Shapiro SD, Baes M, Borgers M, Collen D, Daemen MJ, Carmeliet P. (1999)**  
Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure.  
*Nat Med* 5:1135-1142
- 66. Hochmann JS, Bulkley BH. (1982)**  
Expansion of acute myocardial infarction: an experimental study.  
*Circulation* 65:1446-1450

67. **Hwang MW, Matsumori A, Furukawa Y, Ono K, Okada M, Iwasaki A, Hara M, Miyamoto T, Touma M, Sasayama S.** (2001)  
Neutralization of interleukin-1beta in the acute phase of myocardial infarction promotes the progression of left ventricular remodeling.  
*J Am Coll Cardiol* 38:1546-1553
68. **Inspra, eplerenone (product information).** (2003)  
*Pfizer Pharmaceuticals*
69. **Jorde UP, Vittorio T, Katz SD, Colombo PC, Latif F, Le Jemtel TH.** (2002)  
Elevated plasma aldosterone levels despite complete inhibition of the vascular angiotensin-converting enzyme in chronic heart failure.  
*Circulation* 106:1055-1057
70. **Katada J, Meguro T, Saito H, Ohashi A, Anzai T, Ogawa S, Yoshikawa T.** (2005)  
Persistent cardiac aldosterone synthesis in angiotensin II type 1A receptor-knockout mice after myocardial infarction.  
*Circulation* 111:2157-2164
71. **Kaye DM, Lefkovits J, Jennings GL, Bergin P, Broughton A, Esler MD.** (1995)  
Adverse consequences of high sympathetic nervous activity in the failing human heart.  
*J Am Coll Cardiol* 26:1257-1263
72. **Kayes-Wandover KM, White PC.** (2000)  
Steroidogenic enzyme gene expression in the human heart.  
*J Clin Endocrinol Metab* 85:2519-2525
73. **Kern MJ, Christopher T.** (1998)  
Hemodynamic rounds series II: the LVEDP.  
*Cathet Cardiovasc Diagn* 44:70-74
74. **Kloner RA, Fishbein MC, Lew H, Maroko PR, Braunwald E.** (1978)  
Mummification of the infarcted myocardium by high dose corticosteroids.  
*Circulation* 57:56-63
75. **Knowlton KU, Chien KR.** (1999)  
Inflammatory pathways and cardiac repair: the affliction of infarction.  
*Nat Med* 5:1122-1123
76. **Kobayashi N, Hara K, Tojo A, Onozato ML, Honda T, Yoshida K, Mita S, Nakano S, Tsubokou Y, Matsuoka H.** (2005)  
Eplerenone shows renoprotective effect by reducing LOX-1-mediated adhesion molecule, PKCepsilon-MAPK-p90RSK, and Rho-kinase pathway.  
*Hypertension* 45:538-544

77. **Krum H, Nolly H, Workman D, He W, Roniker B, Krause S, Fakouhi K.** (2002)  
Efficacy of eplerenone added to renin-angiotensin blockade in hypertensive patients.  
*Hypertension* 40:117-123
78. **Kurrelmeyer KM, Michael LH, Baumgarten G, Taffet GE, Peschon JJ, Sivasubramanian N, Entman ML, Mann DL.** (2000)  
Endogenous tumor necrosis factor protects the adult cardiac myocyte against ischemic-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction.  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 97:5456-5461
79. **Laine GA.** (1988)  
Microvascular changes in the heart during chronic arterial hypertension.  
*Circ Res* 62:953-960
80. **Laragh JH, Sealey JE.** (2001)  
K(+) depletion and the progression of hypertensive disease or heart failure. The pathogenic role of diuretic-induced aldosterone secretion.  
*Hypertension* 37:806-810
81. **Leibovich SJ, Ross R.** (1975)  
The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum.  
*Am J Pathol* 78:71-100
82. **Leor J, Rozen L, Zulloff-Shani A, Feinberg MS, Amsalem Y, Barbash IM, Kachel E, Holbova R, Mardor Y, Daniels D, Ocherashvili A, Orenstein A, Danon D.** (2006)  
Ex vivo activated human macrophages improve healing, remodeling, and function of the infarcted heart.  
*Circulation* 114:I94-100
83. **Levy D, Kenchaiah S, Larson MG, Benjamin EJ, Kupka MJ, Ho KK, Murabito JM, Vasan RS.** (2002)  
Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure.  
*N Engl J Med* 347:1397-1402
84. **Levy D, Larson MG, Vasan RS, Kannel WB, Ho KK.** (1996)  
The progression from hypertension to congestive heart failure.  
*JAMA* 275:1557-1562
85. **Li YY, Feng YQ, Kadokami T, McTiernan CF, Draviam R, Watkins SC, Feldman AM.** (2000)  
Myocardial extracellular matrix remodeling in transgenic mice overexpressing tumor necrosis factor-alpha can be modulated by anti-tumor necrosis factor alpha therapy.  
*Proc Natl Acad Sci USA* 97:12746-12751

- 86. Lombes M, Alfaidy N, Eugene E, Lessana A, Farman N, Bonvalet JP.** (1995)  
Prerequisite for cardiac aldosterone action. Mineralocorticoid receptor and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the human heart.  
*Circulation* 92:175-182
- 87. Lombes M, Oblin ME, Gasc JM, Baulieu EE, Farman N, Bonvalet JP.**  
(1992)  
Immunohistochemical and biochemical evidence for a cardiovascular mineralocorticoid receptor.  
*Circ Res* 71:503-510
- 88. Loskutoff DJ, Quigley JP.** (2000)  
PAI-1, fibrosis, and the elusive provisional fibrin matrix.  
*J Clin Invest* 106:1441-1443
- 89. Mani K, Kitsis RN.** (2003)  
Myocyte apoptosis: programming ventricular remodeling.  
*J Am Coll Cardiol* 41:761-764
- 90. Mann DL.** (1999)  
Mechanisms and models in heart failure: a combinatorial approach.  
*Circulation* 100:999-1008
- 91. Mann DL.** (2003)  
Stress-activated cytokines and the heart: from adaptation to maladaptation.  
*Annu Rev Physiol* 65:81-101
- 92. Mannisi JA, Weisman HF, Bush DE, Dudeck P, Healy B.** (1987)  
Steroid administration after myocardial infarction promotes early infarct expansion. A study in the rat.  
*J Clin Invest* 79:1431-1439
- 93. Mason DT.** (1969)  
Usefulness and limitations of the rate of rise of intraventricular pressure (dp-dt) in the evaluation of myocardial contractility in man.  
*Am J Cardiol* 23:516-527
- 94. McKelvie RS, Yusuf S, Pericak D, Avezum A, Burns RJ, Probstfield J, Tsuyuki RT, White M, Rouleau J, Latini R, Maggioni A, Young J, Pogue J.**  
(1999)  
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* 100:1056-1064
- 95. McMurray JJV, Petrie MC, Murdoch DR, Davie AP.** (1998)  
Clinical epidemiology of heart failure. Public and private health burden.  
*Eur Heart J* 19:P9-16

96. **Mihailidou AS, Funder JW.** (2005)  
Nongenomic effects of mineralocorticoid receptor activation in the cardiovascular system.  
*Steroids* 70:347-351
97. **Minatoguchi S, Takemura G, Chen XH, Wang N, Uno Y, Koda M, Arai M, Misao Y, Lu C, Suzuki K, Goto K, Komada A, Takahashi T, Kosai K, Fujiwara T, Fujiwara H.**(2004)  
Acceleration of the healing process and myocardial regeneration may be important as a mechanism of improvement of cardiac function and remodeling by postinfarction granulocyte colony-stimulating factor treatment.  
*Circulation* 109:2572-2580
98. **Mitchell GF, Lamas GA, Vaughan DE, Pfeffer MA.** (1992)  
Left ventricular remodeling in the year after first anterior myocardial infarction.  
*J Am Coll Cardiol* 19:1136-1442
99. **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.** (2001)  
Aldosterone production is activated in failing ventricle in humans.  
*Circulation* 103:72-77
100. **Morimoto H, Takahashi M, Izawa A, Ise H, Hongo M, Kolattukudy PE, Ikeda U.** (2006)  
Cardiac overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in transgenic mice prevents cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction.  
*Circ Res* 99:891-899
101. **Muders F, Elsner D.** (2000)  
Animal models of chronic heart failure.  
*Pharmacol Res* 41:605-612
102. **Nahrendorf M, Hu K, Frantz S, Jaffer FA, Tung CH, Hiller KH, Voll S, Nordbeck P, Sosnovik D, Gattenlohner S, Novikov M, Dickneite G, Reed GL, Jakob P, Rosenzweig A, Bauer WR, Weissleder R, Ertl G.** (2006)  
Factor XIII deficiency causes cardiac rupture, impairs wound healing, and aggravates cardiac remodeling in mice with myocardial infarction.  
*Circulation* 113:1196-1202
103. **Narula J, Haider N, Virmani R, DiSalvo TG, Kolodgie FD, Hajjar RJ, Schmidt U, Semigran MJ, Dec GW, Khaw BA.** (1996)  
Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure.  
*N Engl J Med* 335:1182–1189

- 104. Nishikawa N, Yamamoto K, Sakata Y, Mano T, Yoshida J, Miwa T, Takeda H, Hori M, Masuyama T. (2003)**  
Differential activation of matrix metalloproteinases in heart failure with and without ventricular dilatation.  
*Cardiovasc Res* 57:766-774
- 105. Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, Quaini E, Di Loreto C, Beltrami CA, Krajewski S, Reed JC, Anversa P. (1997)**  
Apoptosis in the failing human heart.  
*N Engl J Med* 336:1131-1141
- 106. Opal SM, DePalo VA. (2000)**  
Anti-inflammatory cytokines.  
*Chest* 117:1162-1172
- 107. Ouvrard-Pascaud A, Sainte-Marie Y, Benitah JP, Perrier R, Soukaseum C, Cat AN, Royer A, Le Quang K, Charpentier F, Demolombe S, Mechta-Grigoriou F, Beggah AT, Maison-Blanche P, Oblin ME, Delcayre C, Fishman GI, Farman N, Escoubet B, Jaisser F. (2005)**  
Conditional mineralcorticoidreceptor expression in the heart leads to life-threatening arrhythmias.  
*Circulation* 111:3025-3033
- 108. Packer M. (1992)**  
The neurohormonal hypothesis: a theory to explain the mechanism of disease progression in heart failure.  
*J Am Coll Cardiol* 20:248-254
- 109. Pfeffer MA, Braunwald E. (1990)**  
Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications.  
*Circulation* 81:1161-1172
- 110. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, Braunwald E. (1979)**  
Myocardial infarct size and ventricular function in rats.  
*Circ Res* 44:503-512
- 111. Pierce GF, Mustoe TA, Lingelbach J, Masakowski VR, Gramates P, Deuel TF. (1989)**  
Transforming growth factor beta reverses the glucocorticoid-induced wound-healing deficit in rats: possible regulation in macrophages by platelet-derived growth factor.  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 86:2229-2233

112. **Pitt B.** (1995)  
"Escape" of aldosterone production in patients with left ventricular dysfunction treated with an angiotensin converting enzyme inhibitor: implications for therapy.  
*Cardiovasc Drugs Ther* 9:145-149
113. **Pitt B.** (2003)  
Aldosterone blockade in patients with acute myocardial infarction.  
*Circulation* 107:2525-2527
114. **Pitt B, Reichek N, Willenbrock R, Zannad F, Phillips RA, Roniker B, Kleiman J, Krause S, Burns D, Williams GH.** (2003)  
Effects of eplerenone, enalapril, and eplerenone/enalapril in patients with essential hypertension and left ventricular hypertrophy. The 4E-Left Ventricular Hypertrophy Study.  
*Circulation* 108:1831-1838
115. **Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, Bittman R, Hurley S, Kleiman J, Gatlin M.** (2003)  
Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction.  
*N Engl J Med* 348:1309-1321
116. **Pitt B, White H, Nicolau J, Martinez F, Gheorghide M, Aschermann M, van Veldhuisen DJ, Zannad F, Krum H, Mukherjee R, Vincent J.** (2005)  
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* 46:425-431
117. **Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J.** (1999)  
The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators.  
*N Engl J Med* 341:709-717
118. **Poon M, Megyesi J, Green RS, Zhang H, Rollins BJ, Safirstein R, Taubman MB.** (1991)  
In vivo and in vitro inhibition of JE gene expression by glucocorticoids.  
*J Biol Chem* 266:22375-22379
119. **Qin W, Rudolph AE, Bond BR, Rocha R, Blomme EA, Goellner JJ, Funder JW, McMahon EG.** (2003)  
Transgenic model of aldosterone-driven cardiac hypertrophy and heart failure.  
*Circ Res* 93:69-76

- 120. Raffetto JD, Khalil RA.** (2007)  
Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease.  
*Biochem Pharmacol*
- 121. Rajagopalan S, Duquaine D, King S, Pitt B, Patel P.** (2002)  
Mineralocorticoid receptor antagonism in experimental atherosclerosis.  
*Circulation* 105:2212-2216
- 122. Ramires FJ, Mansur A, Coelho O, Maranhao M, Gruppi CJ, Mady C, Ramires JA.** (2000)  
Effect of spironolactone on ventricular arrhythmias in congestive heart failure secondary to idiopathic dilated or to ischemic cardiomyopathy.  
*Am J Cardiol* 85:1207-1211
- 123. Ramires FJ, Sun Y, Weber KT.** (1998)  
Myocardial fibrosis associated with aldosterone or angiotensin II administration: attenuation by calcium channel blockade.  
*J Mol Cell Cardiol* 30:475-483
- 124. Robert V, Heymes C, Silvestre JS, Sabri A, Swynghedauw B, Delcayre C.** (1999)  
Angiotensin AT1 receptor subtype as a cardiac target of aldosterone: role in aldosterone-salt-induced fibrosis.  
*Hypertension* 33:981-986
- 125. Rocha R, Chander PN, Khanna K, Zuckerman A, Stier CT Jr.** (1998)  
Mineralocorticoid blockade reduces vascular injury in stroke-prone hypertensive rats.  
*Hypertension* 31:451-458
- 126. Rocha R, Chander PN, Zuckerman A, Stier CT Jr.** (1999)  
Role of aldosterone in renal vascular injury in stroke-prone hypertensive rats.  
*Hypertension* 33:232-237
- 127. Rocha R, Rudolph AE, Frierdich GE, Nachowiak DA, Kekec BK, Blomme EA, McMahan EG, Delyani JA.** (2002)  
Aldosterone induces a vascular inflammatory phenotype in the rat heart.  
*Am J Physiol* 283:H1802-1810
- 128. Rocha R, Stier CT Jr, Kifor I, Ochoa-Maya MR, Rennke HG, Williams GH, Adler GK.** (2000)  
Aldosterone: a mediator of myocardial necrosis and renal arteriopathy.  
*Endocrinology* 141:3871-3878

- 129. Rouleau JL, Packer M, Moye L, de Champlain J, Bichet D, Klein M, Rouleau JR, Sussex B, Arnold JM, Sestier F, et al. (1994)**  
Prognostic value of neurohumoral activation in patients with an acute myocardial infarction: effect of captopril.  
*J Am Coll Cardiol* 24:583-591
- 130. Rudolph AE, Blasi ER, Delyani JA. (2000)**  
Tissue-specific corticosteroidogenesis in the rat.  
*Mol Cell Endocrinol* 165:221-224
- 131. Sadoshima J, Izumo S. (1997)**  
The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress.  
*Annu Rev Physiol* 59:551-571
- 132. Sato A, Funder JW. (1996)**  
High glucose stimulates aldosterone-induced hypertrophy via type I mineralocorticoid receptors in neonatal rat cardiomyocytes.  
*Endocrinology* 137:4145-4153
- 133. Satoh M, Nakamura M, Saitoh H, Satoh H, Akatsu T, Iwasaka J, Masuda T, Hiramori K. (2002)**  
Aldosterone synthase (CYP11B2) expression and myocardial fibrosis in the failing human heart .  
*Clin Sci (Lond)* 102:381-386
- 134. Schäfer A, Fraccarollo D, Hildemann SK, Tas P, Ertl G, Bauersachs J. (2003)**  
Addition of the selective aldosterone receptor antagonist eplerenone to ACE inhibition in heart failure: effect on endothelial dysfunction.  
*Cardiovasc Res* 58:655-662
- 135. Schmidt BM, Oehmer S, Delles C, Bratke R, Schneider MP, Klingbeil A, Fleischmann EH, Schmieder RE. (2003)**  
Rapid nongenomic effects of aldosterone on human forearm vasculature.  
*Hypertension* 42:156-160
- 136. Sheppard KE, Autelitano DJ. (2002)**  
11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 transforms 11-dehydrocorticosterone into transcriptionally active glucocorticoid in neonatal rat heart.  
*Endocrinology* 143:198-204
- 137. Shieh FK, Kotlyar E, Sam F. (2004)**  
Aldosterone and cardiovascular remodeling: focus on myocardial failure.  
*JRAAS* 5:3-13

- 138. Silvestre JS, Heymes C, Oubenaissa A, Robert V, Aupetit-Faisant B, Carayon A, Swynghedauw B, Delcayre C. (1999)**  
Activation of cardiac aldosterone production in rat myocardial infarction: effect of angiotensin II receptor blockade and role in cardiac fibrosis.  
*Circulation* 99:2694-2701
- 139. Silvestre JS, Robert V, Heymes C, Aupetit-Faisant B, Mouas C, Moalic JM, Swynghedauw B, Delcayre C. (1998)**  
Myocardial production of aldosterone and corticosterone in the rat. Physiological regulation.  
*J Biol Chem* 273:4883-4891
- 140. Simpson SAS, Tait JF. (1953)**  
Physicochemical methods of detection of a previously unidentified adrenal hormone.  
*Mem Soc Endocrinol* 2:9-24
- 141. Slight SH, Ganjam VK, Gomez-Sanchez CE, Zhou MY, Weber KT. (1996)**  
High affinity NAD(+)-dependent 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the human heart.  
*J Mol Cell Cardiol* 28:781-787
- 142. Slight SH, Joseph J, Ganjam VK, Weber KT. (1999)**  
Extra-adrenal mineralocorticoids and cardiovascular tissue.  
*J Mol Cell Cardiol* 31:1175-1184
- 143. Small GR, Hadoke PW, Sharif I, Dover AR, Armour D, Kenyon CJ, Gray GA, Walker BR. (2005)**  
Preventing local regeneration of glucocorticoids by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 enhances angiogenesis.  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 102:12165-12170
- 144. Stabile E, Burnett MS, Watkins C, Kinnaird T, Bachis A, la Sala A, Miller JM, Shou M, Epstein SE, Fuchs S. (2003)**  
Impaired arteriogenic response to acute hindlimb ischemia in CD4-knockout mice.  
*Circulation* 108:205-210
- 145. St John Sutton, Lee D, Rouleau JL. (2003)**  
Left ventricular remodeling and ventricular arrhythmias after myocardial infarction.  
*Circulation* 107:2577-2582
- 146. Stockand JD, Meszaros JG. (2003)**  
Aldosterone stimulates proliferation of cardiac fibroblasts by activating Ki-RasA and MAPK1/2 signaling.  
*Am J Physiol* 284:H176-184

- 147. Struthers AD.** (2002)  
Impact of aldosterone on vascular pathophysiology.  
*Congest Heart Fail* 8:18-22
- 148. Sun Y, Ratajska A, Weber KT.** (1995)  
Bradykinin receptor and tissue ACE binding in myocardial fibrosis: response to chronic angiotensin II or aldosterone administration in rats.  
*J Mol Cell Cardiol* 27:813-822
- 149. Sun Y, Weber KT.** (1994)  
Fibrosis and myocardial ACE: possible substrate and independence from circulating angiotensin II.  
*J Card Fail* 1:81-89
- 150. Sutton MG, Sharpe N.** (2000)  
Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy.  
*Circulation* 101:2981-2988
- 151. Suzuki G, Morita H, Mishima T, Sharov VG, Todor A, Tanhehco EJ, Rudolph AE, McMahan EG, Goldstein S, Sabbah HN.** (2002)  
Effects of long-term monotherapy with eplerenone, a novel aldosterone blocker, on progression of left ventricular dysfunction and remodeling in dogs with heart failure.  
*Circulation* 106:2967-2972
- 152. Swan HJ, Forrester JS, Diamond G, Chatterjee K, Parmley WW.** (1972)  
Hemodynamic spectrum of myocardial infarction and cardiogenic shock. A conceptual model.  
*Circulation* 45:1097-1110
- 153. Swedberg K, Eneroth P, Kjeksus J, Wilhelmsen L.** (1990)  
Hormones regulating cardiovascular function in patients with severe congestive heart failure and their relation to mortality. CONSENSUS Trial Study Group.  
*Circulation* 82:1730-1736
- 154. Swynghedauw B.** (1999)  
Molecular mechanisms of myocardial remodeling.  
*Physiol Rev* 79:215-262
- 155. Takeda Y.** (2001)  
Genetic alterations in patients with primary aldosteronism.  
*Hypertens Res* 24:469-474

- 156. Takeda Y, Miyamori I, Yoneda T, Hatakeyama H, Inaba S, Furukawa K, Mabuchi H, Takeda R. (1996)**  
Regulation of aldosterone synthase in human vascular endothelial cells by angiotensin II and adrenocorticotropin.  
*J Clin Endocrinol Metab* 81:2797-2800
- 157. Takeda Y, Miyamori I, Yoneda T, Iki K, Hatakeyama H, Blair IA, Hsieh FY, Takeda R. (1995)**  
Production of aldosterone in isolated rat blood vessels.  
*Hypertension* 25:170-173
- 158. Taqueti VR, Mitchell RN, Lichtman AH. (2006)**  
Protecting the pump: controlling myocardial inflammatory responses.  
*Annu Rev Physiol* 68:67-95
- 159. Torocsik D, Bardos H, Nagy L, Adany R. (2005)**  
Identification of factor XIII-A as a marker of alternative macrophage activation.  
*Cell Mol Life Sci* 62:2132-2139
- 160. Tulner SA, Klautz RJ, van Rijk-Zwikker GL, Engbers FH, Bax JJ, Baan J, van der Wall EE, Dion RA, Steendijk P. (2003)**  
Perioperative assessment of left ventricular function by pressure-volume loops using the conductance catheter method.  
*Anesth Analg* 97:950-957
- 161. Ungerer M, Bohm M, Elce JS, Erdmann E, Lohse MJ. (1993)**  
Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart.  
*Circulation* 87:454-463
- 162. Uusimaa P, Risteli J, Niemela M, Lumme J, Ikaheimo M, Jounela A, Peuhkurinen K. (1997)**  
Collagen scar formation after acute myocardial infarction: relationships to infarct size, left ventricular function, and coronary artery patency.  
*Circulation* 96:2565-2572
- 163. Van Rooijen N, Sanders A. (1994)**  
Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications.  
*J Immunol Methods* 174:83-93
- 164. Volpe M, Savoia C, De Paolis P, Ostrowska B, Tarasi D, Rubattu S. (2002)**  
The renin-angiotensin system as a risk factor and therapeutic target for cardiovascular and renal disease.  
*J Am Soc Nephrol* 13:S173-178

- 165. Weber KT.** (1997)  
Extracellular matrix remodeling in heart failure: a role for de novo angiotensin II generation.  
*Circulation* 96:4065-4082
- 166. Weil J, Schunkert H.** (2006)  
Pathophysiologie der chronischen Herzinsuffizienz.  
*Clin Res Cardiol* 95:1-17
- 167. Weinberger MH, Roniker B, Krause SL, Weiss RJ.** (2002)  
Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in mild-to-moderate hypertension.  
*Am J Hypertens* 15:709-716
- 168. Weisman HF, Healy B.** (1987)  
Myocardial infarct expansion, infarct extension, and reinfarction: pathophysiologic concepts.  
*Prog Cardiovasc Dis* 30:73-110
- 169. White HD, Norris RM, Brown MA, Brandt PW, Whitlock RM, Wild CJ.** (1987)  
Left ventricular end-systolic volume as the major determinant of survival after recovery from myocardial infarction.  
*Circulation* 76:44-51
- 170. White PC, Mune T, Agarwal AK.** (1997)  
11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase and the syndrome of apparent mineralocorticoid excess.  
*Endocr Rev* 18:135-156
- 171. White WB, Duprez D, St Hillaire R, Krause S, Roniker B, Kuse-Hamilton J, Weber MA.** (2003)  
Effects of the selective aldosterone blocker eplerenone versus the calcium antagonist amlodipine in systolic Hypertension.  
*Hypertension* 41:1021-1026
- 172. Yang Z, Zingarelli B, Szabo C.** (2000)  
Crucial role of endogenous interleukin-10 production in myocardial ischemia/reperfusion injury.  
*Circulation* 101:1019-1026
- 173. Yoshimura M, Nakamura S, Ito T, Nakayama M, Harada E, Mizuno Y, Sakamoto T, Yamamuro M, Saito Y, Nakao K, Yasue H, Ogawa H.** (2002)  
Expression of aldosterone synthase gene in failing human heart: quantitative analysis using modified real-time polymerase chain reaction.  
*J Clin Endocrinol Metab* 87:3936-3940

- 174. Young MJ, Clyne CD, Cole TJ, Funder JW. (2001)**  
Cardiac steroidogenesis in the normal and failing heart.  
*J Clin Endocrinol Metab* 86:5121-5126
- 175. Zannad F, Alla F, Dousset B, Perez A, Pitt B. (2000)**  
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* 102:2700-2706
- 176. Zannad F, Dousset B, Alla F. (2001)**  
Treatment of congestive heart failure: interfering the aldosterone-cardiac extracellular matrix relationship.  
*Hypertension* 38:1227-1232

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Johann Bauersachs danke ich für die freundliche Überlassung des Themas, die ausgezeichneten Möglichkeiten zur wissenschaftlichen Bearbeitung sowie für die mühselige Aufgabe des Korrekturlesens.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Daniela Fraccarollo und Herrn Dr. Paolo Galuppo, deren Anleitung, Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei den Experimenten wie auch den statistischen Auswertungen dieser Arbeit mir eine große Hilfe waren. Ebenso danke ich ihnen für die Durchsicht meiner Arbeit und die vielen Hinweise, die zur Vollendung derselben notwendig waren.

Ebenso danke ich meinen Eltern, die mir das Studium und die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht haben.

## **LEBENS LAUF**

### **Persönliche Angaben**

Name:	Hauck, Carolin Dorothee
Geburtsdatum:	13. November 1981
Geburtsort:	Bad Mergentheim
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig
Vater:	Hauck, Richard
Mutter:	Hauck, Ulrike (geb. Strauß)

### **Schulischer Werdegang**

1988-1992	Grundschule der Stadt Lauda-Königshofen
09/1992-06/2001	Martin-Schleyer-Gymnasium Lauda-Königshofen
06/2001	Allgemeine Hochschulreife

### **Universitärer Werdegang**

08/2001-05/2008	Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg
08/2003	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05/2008	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05/2008	Approbation als Ärztin