

**Aus dem Physiologischen Institut
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Vorstand: Prof. Dr. U. Pohl

**Einfluss des dualen Vasopeptidase - Inhibitors
Omapatrilat
auf die postischämische Herz- und Koronarfunktion**

**Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

**vorgelegt von
Jutta Bienefeld
aus
Kempten**

2004

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil B. F. Becker

**Mitberichterstatter: Prof. Dr. J. Remien
Priv. Doz. Dr. C. Reithmann**

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 27.05.2004

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
I.1 Vasopeptidase-Inhibition	1
I.2 ACE – Schlüsselenzym des Renin-Angiotensin-Aldosteron- Systems (RAAS) und Kallikrein-Kinin-Systems	3
I.3 Neutrale Endopeptidase	5
I.4 Die natriuretischen Peptide	6
I.4.1 ANP und N-terminale ANP-Fragmente	8
I.4.2 Weitere natriuretische Peptide	9
I.5 Bradykinin	10
I.6 Omapatrilat (Vanlev™)	11
I.7 Der postischämische Reperfusionsschaden	13
I.7.1 Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen	14
I.7.2 Störung des Kalzium-Haushalts	15
I.7.3 Mikrovaskuläre und endotheliale Dysfunktion	15
I.7.4 Aktivierung von Plättchen, Neutrophilen und Komplement	16
I.8 Fragestellung und experimenteller Ansatz	17
II. Material und Methoden	19
II.1 Material	19
II.1.1 Substanzen	19
II.1.2 Lösungen	20
II.1.3 Versuchstiere	21
II.2 Tierexperimenteller Teil	22
II.2.1 Herzpräparation	22
II.2.2 Langendorff- Modell	23
II.2.3 Arbeitendes Herz	24
II.2.4 Versuchsanordnung	25

II.3 Versuchsablauf	26
II.3.1 Arbeitende Meerschweinchenherzen	26
II.3.2 Rattenherzen im Langendorff-Modus	28
II.3.3 Meerschweinchenherzen im Langendorff-Modus	29
II.3.4 Probenentnahme und Lagerung	29
II.3.5 Zugabe der Substanzen	29
II.4 Analytik	30
II.4.1 Hämodynamische Parameter	30
II.4.2 Biochemische Parameter	30
II.4.3 Berechnete Parameter	31
II.4.4 Statistische Programme und Auswertung	34
III. Ergebnisse	35
III.1 Omapatrilat – Wirkung auf die postischämische Herzfunktion arbeitender Meerschweinchenherzen	35
III.1.1 Funktionelle Parameter	37
III.1.1.1 Erholung der äußeren Herzarbeit	39
III.1.1.2 Koronarvenöser Fluss	41
III.1.1.3 Transsudatmessungen	43
III.1.1.4 Herzfrequenz	45
III.1.2 Metabolische und biochemische Parameter	46
III.1.2.1 Myokardialer Sauerstoffhaushalt	46
III.1.2.2 Effizienz der Herzarbeit	48
III.1.2.3 Laktat – und Pyruvatfreisetzung	48
III.1.2.4 cGMP im koronarvenösen Effluat	49
III.2 Omapatrilat – Wirkung auf die postischämische Freisetzung von ANP, N-terminalem pro-ANP-Fragment [1-30] und TNF-α	51
III.2.1 Funktionelle Parameter	51
III.2.1.1 Koronarvenöser Fluss	51
III.2.1.2 Transsudatmessungen	52
III.2.2 Freisetzung von ANP [1-28]	53
III.2.3 Freisetzung von pro-ANP [1-30]	54
III.2.4 Freisetzung von TNF- α	55

III.3 Wirkung von exogenem pro-ANP [1-30] auf Meerschweinchenherzen	
im Langendorff-Modus	56
III.3.1 Koronarvenöser Fluss	57
III.3.2 Transsudatmessungen	58
IV. Diskussion	59
IV.1 Diskussion der Ergebnisse	59
IV.1.1 Omapatrilat wirkt kardioprotektiv	60
IV.1.1.1 Konzentrationsabhängigkeit	61
IV.1.1.2 Abhängigkeit vom Applikationszeitpunkt	61
IV.1.2 Captopril - ACE-Hemmer mit Sulfhydrylgruppe	63
IV.1.3 Kardioprotektion durch Omapatrilat – ein Bradykinin-vermittelter	
Effekt ?.....	64
IV.1.4 Hemmung der neutralen Endopeptidase – die natriuretischen	
Peptide und weitere mögliche Substrate	65
IV.1.4.1 Exogenes und endogenes ANP	65
IV.1.4.2 N-terminales pro-ANP-Fragment [1-30]	66
IV.1.4.3 Brain natriuretic peptide (BNP)	68
IV.1.4.4 C-type natriuretic peptide (CNP)	69
IV.1.4.5 Endothelin	69
IV.1.4.6 TNF- α	70
IV.1.5 Zwischenbilanz.....	70
IV.1.5.1 Ist eine Vasodilatation an der Kardioprotektion beteiligt?	71
IV.1.5.2 Omapatrilat führt zu einer Steigerung der myokardialen	
mikrovaskulären Permeabilität – BK und ANP als	
Mediatoren?.....	72
IV.1.5.3 Die Rolle von cGMP	73
IV.1.5.4 Myokardialer Sauerstoffhaushalt und Laktat-/Pyruvat-	
Stoffwechsel	74
IV.2 Methodenkritik	76
IV.2.1 Das Modell des isoliert perfundierten Herzens	76
IV.2.2 Herzpräparation	76
IV.2.3 Perfusionsbedingungen und Dauer der Versuchsphasen.....	77

IV.2.4 Perfusionsdauer und Stabilität des Präparates	78
IV.2.5 Transsudatmessung	79
IV.3 Mögliche klinische Relevanz der Ergebnisse	79
V. Zusammenfassung	81
V.1 Ziel der Studie	81
V.2 Material und Methoden	81
V.3 Ergebnisse	82
V.4 Schlussfolgerung	83
VI. Abkürzungsverzeichnis	84
VII. Abbildungsverzeichnis	86
VIII. Literaturverzeichnis	87
IX. Danksagung	105
X. Lebenslauf	106

I. Einleitung

I.1 Vasopeptidase-Inhibition

Der Begriff Vasopeptidase ist aus der Zusammensetzung der beiden Begriffe `vasoaktiv` und `Peptidase` entstanden. So kann unter einer Vasopeptidase jegliche Peptidase verstanden werden, die an der Bildung oder am Abbau vasoaktiver Peptide beteiligt ist (Molinaro, Rouleau, et al. 2002). Eingang in die Literatur erhielt diese Wortschöpfung im Jahre 1999 als Überbegriff für eine neue Medikamentenklasse, die Vasopeptidase-Inhibitoren (VPIs). Kennzeichnend für die ursprünglich auch Metallopeptidase-Inhibitoren genannten Wirkstoffe ist, dass sie als duale VPIs gleichzeitig ACE (angiotensin-converting-enzyme) und NEP (neutrale Endopeptidase) (Burnett 1999) oder sogar als `triple` VPIs, zusätzlich ECE (endothelin-converting-enzyme) hemmen (Ksander, Savage, et al. 1998).

Die Notwendigkeit, neue, effektive Behandlungsstrategien für eine optimierte Einstellung von arteriellem Hypertonus und zur Therapie schon bestehender Herzinsuffizienz zu entwerfen, drängt sich angesichts der hohen Patientenzahlen und einem beträchtlichen, nicht suffizient behandelten Kollektiv auf (Berlowitz, Ash, et al. 1998). Der Gedanke, durch eine kombinierte ACE- und NEP-Hemmung eine bessere Alternative zur ACE-Monotherapie zu bieten, basiert auf den Interaktionen der drei Regulierungssysteme, die für Blutdruck und Flüssigkeitshaushalt zuständig sind. Das RAAS (Renin-Angiotensin-Aldosteron-System), das Kallikrein-Kinin-System und das NPS (natriuretic peptide system) spielen physiologischerweise erfolgreich zusammen und eine selektive Hemmung eines einzelnen Schlüsselenzyms, ACE oder NEP, führt oft nicht zu den erhofften umfassenden und lang anhaltenden Erfolgen, wie es sich gerade im Falle der selektiven NEP-Hemmung, aber auch teilweise bei selektiver ACE-Hemmung zeigte (Corti, Burnett, et al. 2001; Burnett 1999; Cleland & Swedberg 1998; Richards, Wittert, et al. 1993). Ein weiteres denkbare Anwendungsgebiet der Vasopeptidase-Inhibitoren wäre das Management nach Myokardinfarkt (Lapointe, Blais, et al. 2002) und zur Verminderung eines Ischämie-Reperfusionsschadens im Rahmen von Organtransplantationen, nach Kardioplegie bei Herzoperationen, nach PTCA usw., wo derzeit u. a. ACE-Hemmer zum Einsatz kommen (Gurevitch, Pevni, et al. 1997; Korn, Kröner, et al. 2002; Lazar, Volpe, et al. 1998).

Die Tatsache, dass ACE und NEP, beides membranständige, Zink-abhängige Metallopeptidasen, strukturelle Ähnlichkeiten am katalytischen Zentrum aufweisen, ermöglichte die Entwicklung eines dualen Vasopeptidase-Inhibitors (Robl, Sun, et al. 1997). Inzwischen sind mehrere duale Vasopeptidase-Inhibitoren synthetisiert worden, von denen einige zur Zeit in präklinischen und klinischen Studien erprobt werden (Weber 2001), allen voran Omapatrilat (Vanlev™, Bristol-Myers-Squibb), das im Kapitel I.6 näher charakterisiert wird.

I.2 ACE – Schlüsselenzym des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) und Kallikrein-Kinin-Systems

ACE wurde 1956 erstmalig als „hypertensin-converting-enzyme“ isoliert (Skeggs, 1956). Heute ist diese 180 kDa schwere Zink-abhängige Metalloprotease hauptsächlich als Angiotensin-converting-enzyme (ACE) (EC 3.4.15.1), als Kininase II oder Peptidyl-dipeptidase A bekannt. ACE kommt vorwiegend an der Bürstensaummembran der Niere, am Gefäßendothel der Lunge, aber auch in verschiedenen anderen Organen wie Herz, Gehirn und Intestinum vor. Es ist als Ektoenzym mit einem kurzen C-terminalen Ende in der Membran verankert. Beide aktiven katalytischen Zentren sind an der Zelloberfläche exponiert.

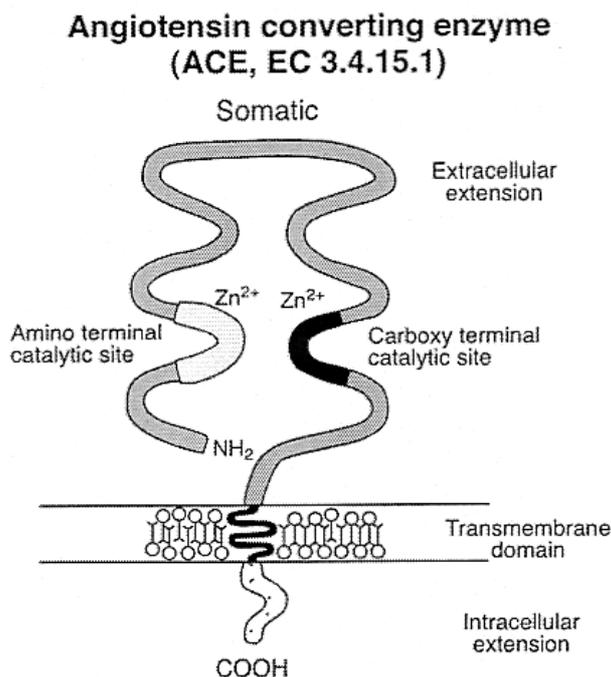


Abb. I.1: Struktur des humanen Angiotensin-Converting-Enzymes (ACE)

Neben den bekanntesten Substraten des ACE, Angiotensin I und Bradykinin, ist das Enzym an der Spaltung einer Reihe weiterer Peptide beteiligt. Dazu gehören Ang (1-7), Kallidin, des-Arg⁹-BK, N-acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro, Substanz P, Enkephaline, LHRH und Neurotensin (Campbell 2003; Eriksson, Danilczyk, et al. 2002; Erdös 1990). Mit der Umwandlung von AT I zu dem potenten Vasokonstriktor AT II hat ACE einen

wesentlichen Einfluss auf die Blutdruckregulation. Zudem spielt Angiotensin II auch eine Rolle bei der Proliferation und Hypertrophie von Endothel- und glatten Muskelzellen in Blutgefäßen (Stroht & Unger 1999). Als Kininase II wandelt ACE Bradykinin in inaktive Metabolite um und schaltet so dessen vasodilatierende Wirkung aus (Linz, Wiemer, et al. 1995; Bhoola, Figueroa, et al.1992). Auf diesen Eigenschaften aufbauend, wurden die ACE-Inhibitoren als pharmazeutische Optionen in der Behandlung des arteriellen Hypertonus, sowie der Herzinsuffizienz synthetisiert. Dort stellen sie heute einen Grundpfeiler in der Therapie dar (Patel, Konstam, et al. 2002). Zudem stellte sich heraus, dass diese Medikamentenklasse neben den hämodynamischen Effekten auch in Situationen nach Ischämie und Reperfusion sowohl kurz- als auch längerfristige positive Wirkungen aufweist (Wang, Pernow, et al. 2002). So können ACE-Hemmer u. a. zu einer Verbesserung der postischämischen Herzfunktion beitragen (Massoudy, Becker, et al. 1995; Linz & Schölkens 1987) und längerfristig bindegewebigen Umbauvorgängen im Myokard nach einem Myokardinfarkt, dem kardialen `remodeling´, entgegenwirken und damit die mittlere Überlebenszeit nach einem solchen Ereignis verlängern (Linz, Wiemer, et al. 1995; Yousef, Redwood, et al. 2000; Pfeffer, Braunwald, et al. 1992).

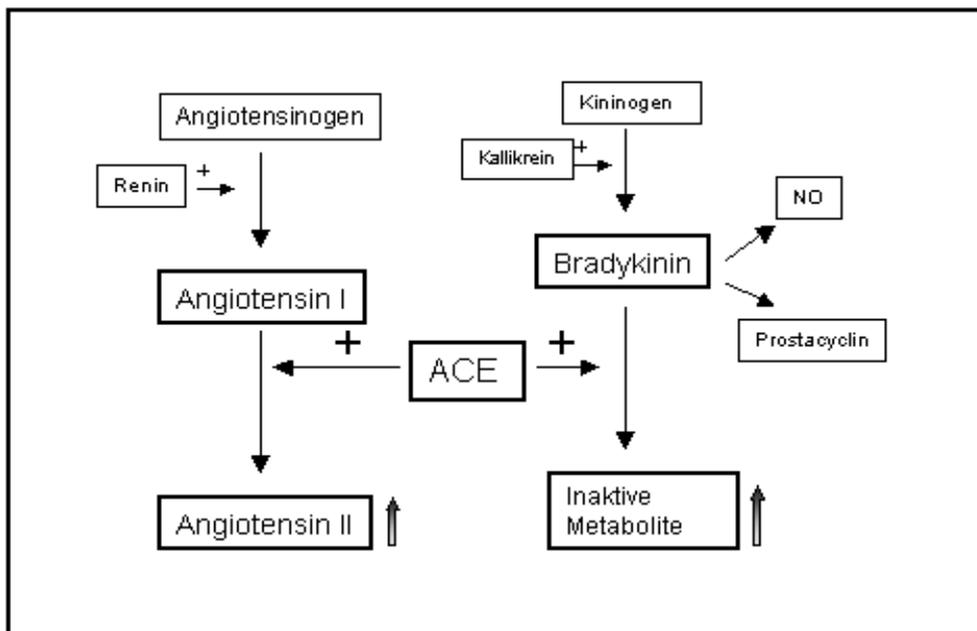


Abb. I.2: Renin-Angiotensin-Aldosteron-System und Kallikrein-Kinin-System

I.3 Neutrale Endopeptidase

Die neutrale Endopeptidase EC 3.4.24.11, auch Enkephalinase oder Neprilysin genannt, wird der Familie der M 13 Membran-Metallopeptidasen (MME) zugeordnet und ist ein membrangebundenes, an der Zelloberfläche lokalisiertes Enzym, das in vielen Organen und Geweben vorkommt. Hohe Aktivitäten finden sich im Tubulussystem der Niere, im ZNS, in der Gefäßwand aber auch im Parenchym von Herz, Lungen, Intestinum und Nebennieren (Veelken & Schmieder 2002; Weber 2001; Erdös & Skidgel 1989; Roques, Noble, et al. 1993). NEP ist ein Metalloenzym mit Zink im aktiven Zentrum, das Peptide am N-terminalen Ende hydrophober Aminosäuren spaltet. Damit greift die neutrale Endopeptidase in vielfältiger Weise in die Funktion endogener Peptide ein. Sie inaktiviert vasodilatierende Substanzen wie die natriuretischen Peptide ANP, BNP und CNP, Bradykinin, Adrenomedullin und ist am Abbau von Substanz P, Endothelin I, Angiotensin II u. a. beteiligt (Molinaro, Rouleau, et al. 2002; Erdös & Skidgel 1989; Roques, Noble, et al. 1993). Zudem weist NEP, wie schon erwähnt, strukturelle Ähnlichkeit mit der katalytischen Untereinheit des ACE auf.

Da die neutrale Endopeptidase am Abbau kardiovaskulärer und renal wirksamer Peptide beteiligt ist, ging man davon aus, dass eine NEP-Hemmung eine attraktive Möglichkeit zur Behandlung von arterieller Hypertonie und Herzinsuffizienz wäre. In klinischen Studien jedoch erwiesen sich die selektiven NEP-Inhibitoren als nicht suffizient, da bei längerfristiger NEP-Hemmung eine kompensatorische Aktivierung des RAAS eintrat, was die zuvor erreichte Blutdrucksenkung relativierte (Kentsch, Otter, et al. 1996; Richards, Wittert, et al. 1993). Ein weiterer möglicher Grund für die limitierte Wirkung der selektiven NEP-Hemmer könnte die Unspezifität der Neutralen Endopeptidase sein, die auch am Abbau vasokonstriktorischer Peptide wie Angiotensin II und Endothelin beteiligt ist (Sagnella 2001; Richards, Wittert, et al. 1993).

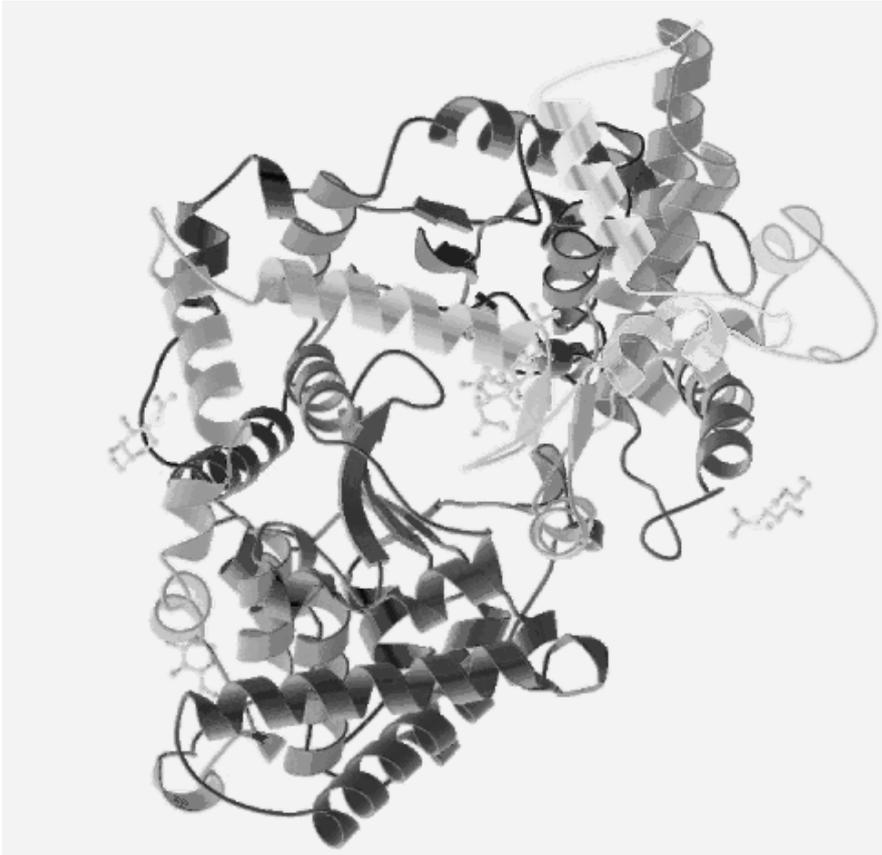


Abb. I.3: Struktur der humanen neutralen Endopeptidase (mit Phosphoramidon)

I.4 Die natriuretischen Peptide

Die wichtigsten Vertreter aus der Familie der natriuretischen Peptide sind derzeit: ANP (atrial natriuretic peptide), BNP (brain natriuretic peptide) und CNP (C-type natriuretic peptide). Jedes einzelne dieser natriuretischen Peptide unterliegt einer eigenen, spezifischen Gewebeverteilung und Regulierung. Strukturell gesehen verbindet diese Peptide ein allen gemeinsamer 17 Aminosäuren langer, über eine intramolekulare Disulfidbrücke zusammengefügtter Cys-Cys-Ring (Abb. I.4). Das NPS (natriuretic-peptide-system) zeigt eine Vielfalt von möglichen Wirkungen, wie Natriurese, Diurese, Vasodilatation, eine Hemmung des RAAS (Renin-Angiotensin-Aldosteron-System), eine Verringerung der Zellproliferation in Blutgefäßen und Myokard sowie Hemmung des Sympathikus (Corti, Burnett, et al. 2001; Levin, Gardner, et al. 1998).

Die Aktivität der natriuretischen Peptide erfolgt über Rezeptoren an der Oberfläche der Zielzellen (NPR-A und NPR-B), die über die membranständige Guanylylcyclase

(particulate guanylyl cyclase, PGC), zu einer Bildung von cGMP als second messenger führen. Der Abbau der natriuretischen Peptide wird, je nach Gewebelokalisation zu verschiedenen Anteilen, zum einen von der neutralen Endopeptidase (NEP), zum anderen vom NPR-C (natriuretic-peptide-clearance-receptor) übernommen (Levin, Gardner, et al. 1998; Sagnella 2001). Vorrangig aufgrund ihrer hämodynamischen Effekte rücken die natriuretischen Peptide oder synthetisierte Designer-Peptide immer mehr ins Interesse und werden derzeit teils in präklinischen und klinischen Studien getestet (Sagnella 2001; Colucci, Elkayam, et al. 2000). Auch in der Diagnostik nimmt die Bedeutung der natriuretischen Peptide zu (Maisel, Krishnaswamy, et al. 2002).

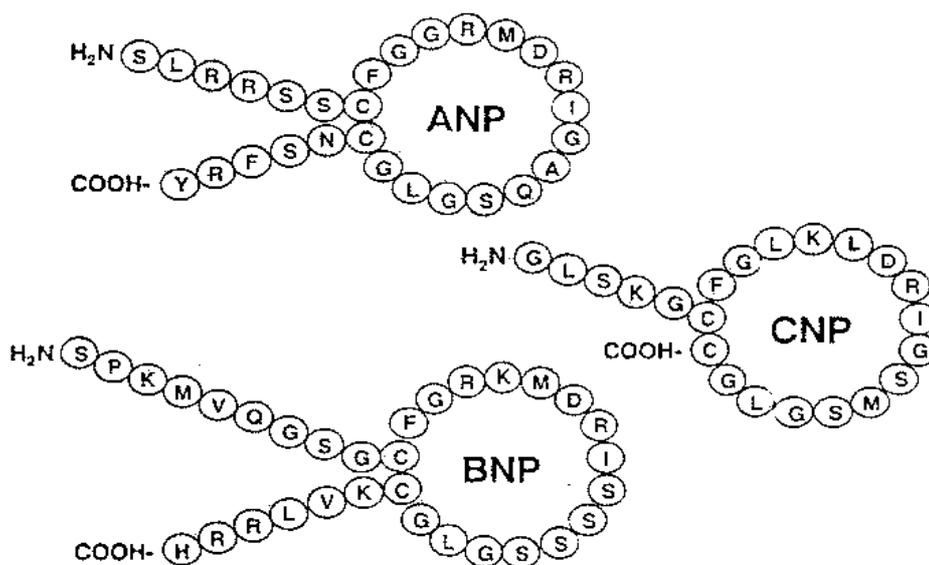


Abb. 1.4: Struktur der natriuretischen Peptide

I.4.1 ANP und N-terminale ANP-Fragmente

Atrial natriuretic peptide, 1981 von de Bold erstmalig entdeckt (de Bold, Borenstein, et al. 1981), wird vorwiegend in den Herzvorhöfen produziert, dort in Granula gespeichert und u. a. bei erhöhter Vorhofwandspannung, die den Hauptstimulus für die Freisetzung von ANP darstellt, freigesetzt (Stein & Levin 1998). Das 126 Aminosäuren lange Präkursor-Protein pro-ANP wird in ein 98 AS langes Amino-Fragment (1-98), sowie in ein aus 28 AS bestehendes Carboxy-Fragment (99-126) gespalten, das dem reifen ANP (α -ANP [1-28]) entspricht. Beide Fragmente sind im humanen Blutplasma nachweisbar. Erhöhte Plasmaspiegel werden u. a. bei Patienten mit Herzinsuffizienz (Levin, Gardner, et al. 1998; Burnett 1999) und nach Myokardinfarkt (Wilkins, Redondo, et al. 1997; Stein & Levin 1998) beobachtet. Des Weiteren gibt es mehrere andere pro-ANP-Fragmente, die ebenfalls biologisch aktiv zu sein scheinen: Fragment 1-30, 'long acting natriuretic peptide' genannt, Fragment 31-67 oder 'vessel dilator peptide' und 'kaliuretic peptide' (Fragment 79-98) (Vesely 2001; Vesely, Dietz, et al. 1999). ANP übt seine Wirkung vorwiegend über Bindung an den NPR-A-Rezeptor aus, der eine cGMP-abhängige Signalkaskade aktiviert (Levin, Gardner, et al. 1998). Die ANP-abhängige Blutdrucksenkung kommt zum einen durch Auslösung einer Natriuresis und Diuresis in der Niere, einer gegenregulatorischen Hemmung des RAAS und einer Vasodilatation zustande. Zum anderen wird eine Flüssigkeitsverschiebung in den Extravasalraum durch erhöhte Endothelpermeabilität diskutiert (Wijeyaratne & Moulton 1993). Durch Verminderung der sympathikotonen Wirkung am peripheren Gefäßsystem führen erhöhte ANP-Spiegel zu einer Vasorelaxation. Zudem werden sowohl ANP als auch BNP parakrine Eigenschaften zuteil, indem sie auf die glatten Muskelzellen der Gefäßwände proliferationshemmend wirken und einer Myokardhypertrophie entgegenwirken (Itoh, Pratt, et al. 1990; Corti, Burnett, et al. 2001; Hayashi, Tsutamoto, et al. 2001). Noch nicht ganz geklärt ist die Rolle von ANP bezüglich der Hemmung des Vasokonstriktors Endothelin (Ando, Rahman, et al. 1995; Hu, Levin, et al. 1992; Ruschitzka, Corti, et al. 1999).

I.4.2 Weitere natriuretische Peptide

BNP wird v. a. im Ventrikelmyokard produziert. Der adäquate Stimulus für die Freisetzung von BNP ist ein gesteigertes Ventrikelvolumen. Erhöhte Plasmaspiegel an BNP werden demnach z. B. bei Patienten mit ventrikulärer Hypertrophie und Herzinsuffizienz gefunden (Maisel, Krishnaswamy, et al. 2002). Pro-BNP ist ein 108 Aminosäuren langes Molekül, reifes BNP besteht aus 32 AS. Die Wirkung erfolgt zum Grossteil über die Bindung an den NPR-A, der Abbau, wie auch bei ANP, über die neutrale Endopeptidase und den NPR-C (natriuretic-peptide-clearance-receptor) (Levin, Gardner, et al. 1992; D'Souza, Yellon, et al. 2003; Wilkins, Redondo, et al. 1997).

Von CNP existieren zwei Formen: eine 22 AS lange Form und ein aus 53 AS bestehendes Molekül. Die kürzere Form ist biologisch aktiver und herrscht auch quantitativ vor. Insgesamt sind jedoch die Plasmakonzentrationen an CNP sehr gering (Clavell, Stingo, et al. 1993). CNP ist im Organismus weit verbreitet und kommt sowohl in Niere, Lunge, Herz, ZNS als auch in Endothelzellen der Gefäßwand vor (Levin, Gardner, et al. 1998; Barr, Rhodes, et al. 1996). Den adäquaten Reiz für die CNP-Freisetzung stellen Scherkräfte am Endothel dar. Die Wirkung von C-type natriuretic Peptide scheint, entgegen seinem Namen nicht natriuretisch zu sein, sondern eher lokal am Endothel anzusetzen (Clavell, Stingo, et al. 1993) und dort zu einer Vasodilatation zu führen. Ferner wirkt es, ähnlich wie ANP, antiproliferativ (Levin, Gardner, et al. 1998; Chen & Burnett 1998). CNP bindet vorwiegend an den NPR-B. Über ein Zusammenspiel mit NO bei der Beeinflussung des Gefäßtonus (Wennberg, Miller, et al. 1999) als auch über eine Beteiligung bei der Entstehung atheromatöser Plaques (Brown, Chen, et al. 1997) werden Mutmaßungen angestellt.

Ein weiteres, erst kürzlich aus dem Gift der grünen Mamba (*Dendroaspis angusticeps*) isoliertes Mitglied der Peptidfamilie ist DNP (*Dendroaspis natriuretic peptide*) (Schweitz, Vigne, et al. 1992). Funktion und Vorkommen von DNP sind noch weitgehend ungeklärt, jedoch gibt es Hinweise auf eine Immunreaktivität von DNP sowohl im humanen Plasma als auch im Vorhofmyokard. DNP zeigt eine, dem ANP ähnliche natriuretische und diuretische Wirksamkeit; des Weiteren wird über vasorelaxierende Eigenschaften und eine starke Erhöhung der cGMP-Spiegel

berichtet. Es soll eine erhöhte Resistenz gegenüber der neutralen Endopeptidase aufweisen (Lisy, Jougasaki, et al. 1999; Schirger, Heublein, et al. 1999).

Sowohl Urodilatin, ein aus dem Urin isoliertes pro-ANP Fragment (95-126), sowie Adrenomedullin, ein aus Phäochromozytomen isoliertes Peptid zeigen natriuretische und vasodilatierende Eigenschaften (Levin, Gardner, et al. 1998; Lisy, Jougasaki, et al. 1998). Eine Applikation von Urodilatin scheint den Reperfusionsschaden zu verringern (Inserte, Garcia-Dorado, et al. 2000). Adrenomedullin soll z. B. bei Herzinsuffizienz positive hämodynamische Effekte ausüben (Nagaya, Satoh, et al. 2000).

I.5 Bradykinin

Das Nonapeptid Bradykinin stellt den prominentesten Vertreter der, aus einer Reihe potenter, bioaktiver Autakoide bestehenden Kinin-Familie dar, die durch Abspaltung vom Vorläufer Kininogen entstehen (siehe Abb. I.2). Die Konzentration und damit die Wirksamkeit der Kinine hängt insbesondere von ihrem enzymatischen Abbau ab (Regoli & Barabe 1980; Linz, Wiemer, et al. 1995; Kokkonen, Lindstedt, et al. 2000). Im Herzen sind sowohl ACE, als auch die neutrale Endopeptidase daran beteiligt, wobei bezüglich der Lokalisation Unterschiede vermutet werden. So scheint im Interstitium die neutrale Endopeptidase maßgeblich an der Degradierung des Bradykinins beteiligt zu sein, im Gefäßbett ACE den Grossteil des Abbaus zu übernehmen (Kokkonen, Lindstedt, et al. 2000). Bradykinin zeigt vor allem hämodynamische Wirkungen, indem es über die Freisetzung von NO, Prostaglandinen (Lamontagne, König, et al. 1992) und EDHF (endothelium-derived hyperpolarizing factor) (Hecker, Bara, et al. 1994) vasorelaxierend wirkt. Neben positiven Kurzzeiteffekten nach Myokardinfarkt, sowie postischämischer Reperfusion, sind auch längerfristige Auswirkungen bekannt, wie eine Reduktion der linksventrikulären Hypertrophie, als auch das Aufhalten einer Progression einer Herzinsuffizienz. Kinine üben ihre pharmakologische Wirkung über die Aktivierung von BK₁- und BK₂-Rezeptoren aus, wobei Lys-BK (Kallidin) und BK Agonisten des BK₂-Rezeptors sind, Lys-BK und BK (1-8) am BK₁-Rezeptor binden (Dumoulin, Adam, et al. 1998; Raut, Rouleau, et al. 1999; Kokkonen, Lindstedt, et al. 2000).

I.6 Omapatrilat (Vanlev™)

Omapatrilat (BMS 186716, Vanlev™) ist der Vasopeptidase-Inhibitor, der in seiner Klasse innerhalb der klinischen Studien am weitesten fortgeschritten ist. Arterieller Hypertonus und Herzinsuffizienz stellen mögliche Einsatzgebiete dar. Abb. I.5 zeigt die chemische Struktur von Omapatrilat ($C_{19}H_{24}N_2O_4S_2$), dessen Molekulargewicht 408.5 Da beträgt. Omapatrilat hemmt selektiv kompetitiv gleichzeitig NEP und ACE, wobei die Hemmkonstanten ca. 8,9 nM für NEP und 6,0 nM für ACE betragen (Rouleau, Pfeffer, et al. 2000; Burnett 1999). In Konzentrationen bis zu 100 $\mu\text{mol/l}$ konnte keine Hemmung anderer Metalloproteasen (wie z. B. Kollagenase, Carboxypeptidase A und B, Aminopeptidase, Endothelin-converting-enzym, Matrix-Metalloprotease) beobachtet werden (Weber 2001).

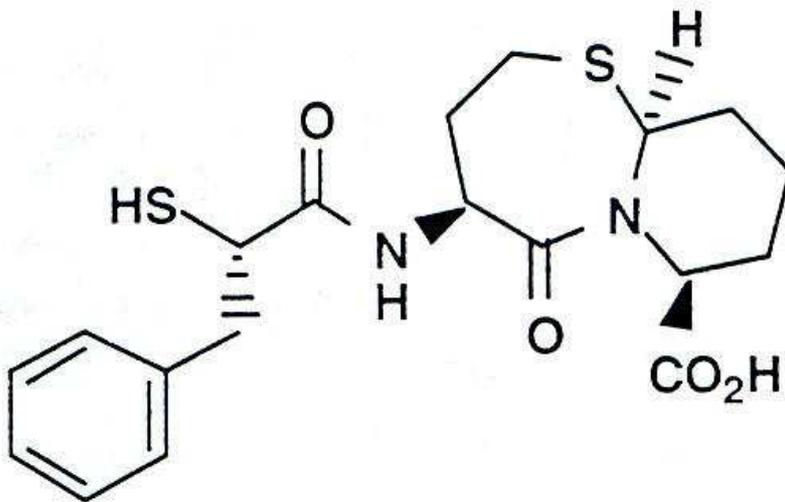


Abb. I.5: Chemische Struktur von Omapatrilat

Omapatrilat hat eine orale Bioverfügbarkeit von 30% und wird aufgrund seines lipophilen Charakters zu ca. 80% an Plasmaeiweiß gebunden. Omapatrilat wird hepatisch metabolisiert und renal eliminiert. Die effektive Halbwertszeit liegt bei 14-19 Stunden (Quaschnig, Corti, et al. 2000; Rouleau, Pfeffer, et al. 2000).

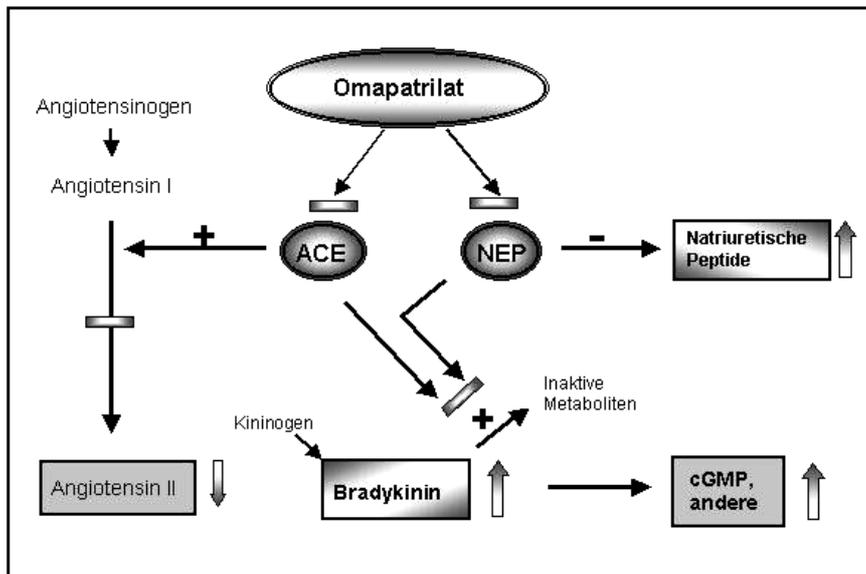


Abb. I.6: Wirkmechanismus des Vasopeptidase-Inhibitors Omapatrilat

In einigen präklinischen und klinischen Studien hat sich Omapatrilat als ein wirkungsvolles Therapeutikum erwiesen. Bei Versuchen mit Ratten erzielte eine Einmaldosis Omapatrilat in allen drei Renin-Modellen eine signifikante Senkung des mittleren arteriellen Drucks (Trippodo, Robl, et al. 1998). Ferner führte Omapatrilat bei Salz-sensitiven Dahl-Ratten zu einer weitaus größeren endothelabhängigen Relaxation, als eine Behandlung mit dem selektiven ACE-Hemmer Captopril (Quaschnig, Corti, et al. 2000). In Versuchsreihen mit kardiomyopathischen Hamstern zeigte eine Behandlung mit Omapatrilat verlängerte Überlebenszeiten, verglichen mit dem ACE-Inhibitor Captopril (Trippodo, Robl, et al. 1998). Bei Hunden mit einer, durch elektrische Überstimulation induzierter Herzinsuffizienz, führte Omapatrilat zu einer verbesserten kontraktiven Restfunktion (Thomas, McDaniel, et al. 1998). Sowohl die präklinischen Studien als auch die anschließenden groß angelegten klinischen Studienprogramme, die die Wirksamkeit und Sicherheit von Omapatrilat für die zugelassenen Anwendungsgebiete (arterielle Hypertonie und Herzinsuffizienz) testen sollten (IMPRESS, OPERA, OKTAVE und OVERTURE), erzielten insgesamt recht ermutigende Ergebnisse (Rouleau, Pfeffer, et al. 2000; Sheth, Parker, et al. 2002; Coats 2002; Packer, Califf, et al. 2002; Nawarskas, Rajan, et al. 2001). Die OVERTURE-Studie ergab jedoch, entgegen den Erwartungen, keinen Vorteil von Omapatrilat zu Enalapril. Zudem trat das bei ACE-Hemmung schon bekannte Angioödem bei Omapatrilat-behandelten Patienten deutlich häufiger

auf. Diese Erkenntnisse stoppten die Zulassung des Vasopeptidase-Inhibitors Omapatrilat bis auf weiteres (Coats 2002).

I.7 Der postischämische Reperfusionsschaden

Eine Unterbrechung des Blutflusses, also ein Perfusionsstopp, verursacht, je nach Dauer und Art des Gewebes, einen Ischämieschaden. Paradoxerweise löst eine Wiederherstellung des Blutflusses, die im Falle des Herzens die Rettung des ischämischen Myokards darstellt, selbst eine Kaskade von Ereignissen aus, die zu einer zusätzlichen Zellschädigung, dem sogenannten Reperfusionsschaden führt. So beschreibt der Reperfusionsschaden einen, von einer vorausgehenden Ischämie abhängigen, weiteren Prozess, der von einer erneuten Perfusion des geschädigten Gewebes ausgelöst wird (Piper, Garcia-Dorado, et al. 1998; Anaya-Prado & Toledo-Pereyra 2002). Obwohl die Abgrenzung zwischen den durch Ischämie und Reperfusion bedingten Schaden nicht immer eindeutig ist, besteht doch inzwischen Einvernehmen über die Existenz eines eigenständigen, der ischämischen Phase folgenden Reperfusionsschadens (Hearse & Bolli 1992, Bolli 1992; Fox 1992). Bei der Schwere und Ausdehnung des Reperfusionsschadens spielt die Dauer der vorangegangenen Ischämie eine wesentliche Rolle. So ist bei einer sehr kurzen Ischämiezeit ein zu vernachlässigender bis geringer Reperfusionsschaden zu erwarten. Ebenso wird bei einer sehr lang anhaltenden, eventuell schon zur Nekrose führenden Ischämie die Reperfusion einen relativ geringeren zusätzlichen Schaden herbeiführen (Gebhard 1990).

Im klinischen Alltag tritt der Ischämie-Reperfusionsschaden bei einer Reihe von Krankheitsbildern und therapeutischen Interventionen auf, wie z. B. bei Myokardinfarkt, cerebralen Insulten, PTCA (perkutane transluminale Koronarangioplastie), Kardioplegie bei Herzoperationen, Organtransplantationen, usw. (Verma, Fedak, et al. 2002) und ist daher Gegenstand vieler Studien. Der Reperfusionsschaden des Herzens wird durch myokardiale, kardiovaskuläre und elektrophysiologische Dysfunktion, die durch den wiedereinsetzenden Blutfluss bedingt ist, apparent. Klinisch äußert er sich durch Arrhythmien, myokardiales `stunning´ (reversible, kontraktile Dysfunktion), Endothelschäden und Zelluntergang (letaler Reperfusionsschaden) (Hearse & Bolli 1992).

Mechanismen, die zur Entwicklung eines Reperfusionsschadens beitragen, sind die Bildung freier Sauerstoffradikale, eine intrazelluläre Ca^{2+} -Überladung, endotheliale und mikrovaskuläre Dysfunktion, sowie die Aktivierung von Plättchen, Neutrophilen und Plasma-Komplement (Wang, Pernow, et al. 2002; Verma, Fedak, et al. 2002). Zusätzlich kommt es zur akuten Freisetzung des inflammatorischen Zytokins $\text{TNF-}\alpha$ (Gurevitch, Frolkis, et al 1996).

I.7.1 Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen

Freie Radikale, vor allem Hydroxylradikal (OH), Superoxid (O_2^-) und Stickoxid (NO), sowie Oxidantien wie H_2O_2 , HOCl und ONOO^- spielen eine zentrale Rolle bei der Entstehung des Reperfusionsschadens (Verma, Fedak, et al. 2002; Anaya-Prado, Toledo-Pereyra, et al. 2002; Hearse & Bolli 1992, Becker, Massoudy, et al. 1993). Freie Radikale sind dadurch gekennzeichnet, dass sie ein ungepaartes Elektron enthalten und daher äußerst reaktionsfreudig sind. Mit Einsatz der Reperfusion können innerhalb weniger Minuten große Mengen an Sauerstoffradikalen und Oxidantien entstehen, die bis zu Stunden nach Wiedereinsetzen des Blutflusses weiterproduziert werden (Bolli, Jeroude, et al., 1989; Ambrosio & Tritto 1999). Molekularer Sauerstoff, der auf das ischämische Gewebe trifft, stellt eine Quelle für die O_2 -Radikalbildung dar, zum anderen spielen die Enzyme Xanthin-Oxidase, Cytochrom-Oxidase, Cyclooxygenase und NO-Synthase eine Rolle, sowie die Oxidation von Katecholaminen. Auch sind die Aktivierung von Neutrophilen und die Freisetzung von PAF (platelet activating factor) am Entstehungsprozess der reaktiven Sauerstoffverbindungen beteiligt (Verma, Fedak, et al. 2002; Carden & Granger 2000).

Zudem sind die endogenen Schutzmechanismen, z.B. enzymatische Radikalfänger und Antioxidantien wie Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase, Katalase u. a., durch die Ischämie geschädigt und können dem Reperfusionsschaden nicht oder nur eingeschränkt entgegenwirken (Wang, Pernow, et al. 2002; Verma, Fedak, et al. 2002).

I.7.2 Störung des Kalzium-Haushalts

Während der Ischämiezeit kommt es nach der Depolarisation der Zellmembranen zu einem massiven Kalziumeinstrom in den Intrazellulärraum. Zusätzlich wird intrazellulär Kalzium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum freigesetzt. Unter physiologischen Umständen würde nach dem Kalziumeinstrom eine Muskelkontraktion folgen. Da aufgrund der Ischämie nur noch ungenügend ATP zur Kontraktion zur Verfügung steht, kommt es erst mit Einsetzen der Reperfusion und damit der erneuten Möglichkeit zur Bildung der nötigen Energieäquivalente zur Kontraktion. Die extrem erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration führt bei wieder bereitgestelltem ATP zu unkontrollierten Hyperkontrakturen der Kardiomyozyten, vor allem in der ersten Phase der Reperfusion, was zu schweren Schäden des zellulären Cytoskeletts oder gar zum Zelltod führen kann (Piper, Siegmund, et al. 1996; Piper, Garcia-Dorado, et al. 1998).

Des Weiteren werden Zellschädigungen durch Kalzium-aktivierte Proteasen, als auch eine Proteolyse des Troponin I diskutiert (Bolli & Marban 1999; Gao, Atar, et al. 1997; Gao, Liu, et al. 1996)

I.7.3 Mikrovaskuläre und endotheliale Dysfunktion

Ischämie und Reperfusion führen zu einer Dysregulation des Endothels. So stellt das Endothel in dieser Situation eine Quelle potenter Vasokonstriktoren, wie z.B. Endothelin I oder der oben genannten Sauerstoffradikale (scavenger des Vasodilatators NO) dar, was zu einer Reduktion des Koronarflusses führen kann. Zusätzlich trägt das geschädigte Endothel zur Aktivierung von Neutrophilen und Plättchen, als auch zum Austritt von Flüssigkeit und Proteinen und damit zur Ödembildung bei (Wang, Pernow, et al. 2002; Carden & Granger 2000; Verma, Fedak, et al. 2002).

I.7.4 Aktivierung von Plättchen, Neutrophilen und Komplement

Das aktivierte Endothel erfährt eine vermehrte Expression von Adhäsionsproteinen und eine gesteigerte Zytokinfreisetzung. Zudem werden im ischämischen bzw. minderperfundierten Gefäßsystem auch Blutplättchen aktiviert. Diese Mechanismen fördern die Adhärenz, Aktivierung und Akkumulation von Neutrophilen und Monozyten im reperfundierten Gewebe. Die so aktivierten Neutrophilen können bei der Entwicklung des Reperfusionsschadens eine entscheidende Rolle spielen, indem sie Sauerstoffradikale, Proteasen und Entzündungsmediatoren freisetzen (Hansen 1995; Park & Lucchesi 1999) und zusätzlich durch eine mechanische Blockade einer suffizienten Reperfusion entgegen stehen. Diese Störung im mikrovaskulären System wird als „no-reflow“-Phänomen bezeichnet (Ambrosio & Tritto 1999). Die Aktivierung des Komplementsystems während der Ischämie und Reperfusion führt zu einer direkten Schädigung des Gewebes über eine Steigerung der Zellpermeabilität sowie zur Freisetzung von Histamin und PAF (Hansen 1995; Wang, Pernow, et al. 2002). Die Beteiligung dieser Mechanismen am Reperfusionsschaden *in vivo* muss berücksichtigt werden, obwohl auch in Modellen eines isoliert perfundierten Herzens mit kristallinen Lösungen ohne Zusatz von Blutzellen und Plasma ebenfalls eine deutliche Schädigung durch die Reperfusion entsteht (Wang, Pernow, et al. 2002).

I.8 Fragestellung und experimenteller Ansatz

Ziel der vorliegenden Studie war, eine mögliche kardioprotektive Wirkung von Omapatrilat nach globaler Ischämie und darauf folgender Reperfusion zu eruieren. Im Falle einer Verbesserung der postischämischen Herzfunktion sollten die daran beteiligten Mechanismen geklärt werden.

Die Überlegungen hierzu spiegeln die im Folgenden aufgestellten Fragen wieder.

1. Zeigt Omapatrilat eine hämodynamisch fassbare Wirkung nach globaler Ischämie?
2. Welche Konzentration ist hierbei erforderlich und spielt der Zeitpunkt der Applikation in Relation zur Ischämie eine Rolle?
3. Wird die Wirkung von Omapatrilat durch Bradykinin vermittelt?
4. Welche Rolle spielen die natriuretischen Peptide, allen voran ANP und das pro-ANP-Fragment [1-30]?
5. Ist die Sulfhydrylgruppe im Molekül von Omapatrilat an einer Kardioprotektion beteiligt?
6. Sind erhöhte cGMP-Spiegel Mediatoren des protektiven Effekts?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden zum einen Untersuchungen an isoliert arbeitenden Meerschweinchenherzen durchgeführt, die vorrangig zur Erfassung hämodynamischer Parameter dienen sollten. Zum anderen wurden zur Peptid- bzw. Zytokinbestimmung Rattenherzen im Langendorff-Modus als Versuchsmodell herangezogen. Alle Herzen wurden einer globalen normothermen Ischämie unterzogen und darauf folgend reperfundiert. Die Druck-Volumen-Arbeit verrichtenden Meerschweinchenherzen wurden in sieben Versuchsgruppen

unterteilt. Alle sieben Gruppen durchliefen das gleiche zeitliche Perfusionsprotokoll, das neben der zehnminütigen Ischämie und 15 minütigen Reperfusion jeweils eine prä- und eine postischämische Arbeitsphase beinhaltete. Vergleichend zu einer Kontrollgruppe sollte in zwei weiteren Gruppen jeweils die Wirkung von Omapatrilat konzentrationsabhängig bzw. bezüglich des Applikationszeitpunktes ermittelt werden. Eine Gruppe wurde mit Omapatrilat und Icatibant (HOE 140), einem Bradykinin-Rezeptor-Antagonisten, perfundiert. Eine weitere Gruppe erhielt exogenes ANP, die letzte Gruppe wurde mit Captopril, einem Sulfhydryl-Gruppe enthaltenden ACE-Hemmer perfundiert. Neben den hämodynamischen wurden auch metabolische Parameter, sowie cGMP-Spiegel aus den Versuchen mit Meerschweinchenherzen bestimmt. Die Analyse von natriuretischen Peptiden, sowie des Zytokins Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- α) erfolgte aus Rattenherzen, da hier immunologische Nachweismethoden zur Verfügung stehen.

II. Material und Methoden

Alle folgenden Tests und Untersuchungen wurden im Zeitraum von Mai 2000 bis November 2002 am Physiologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München, Lehrstuhl Prof. Dr. U. Pohl, in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. B.F. Becker, durchgeführt.

II.1 Material

II.1.1 Substanzen

Albumin (aus Rinderblut):	Merck, Darmstadt, Deutschland
ANP:	Atriopeptin III, Rat, Calbiochem-Novabiochem GmbH, Schwalbach, Deutschland
Bradykinin:	Sigma, Unterhaching, Deutschland
Captopril:	von Heyden GmbH, Regensburg, Deutschland
CO₂:	Firma Linde, Höllriegelskreuth, Deutschland
Ether:	Hoechst AG, Frankfurt a. Main, Deutschland

Icatibant (HOE 140): selektiver Bradykinin B₂-Rezeptor-Antagonist,
Hoechst AG, Frankfurt am Main, Deutschland

O₂: Firma Linde, Höllriegelskreuth, Deutschland

Omapatrilat, [4S-[4α(R+), 7α, 10αβ]]-Octahydro-4-[(2-Mercapto-1-oxo-3-Phenylpropyl) Amino] -5-oxo-7H-Pyrido[2,1-b][1,3]-Thiazepine-7-Carboxylsäure, wurde großzügigerweise von der Bristol-Myers-Squibb Company, Pharmaceutical Research Institute, Princeton, New Jersey, zur Verfügung gestellt.

Pro-ANP [1-30]: Sequenz: npmynavsnadlmdfknldhleekmpled
Laboratorium für Molekulare Biologie
(Genzentrum), München

Alle weiteren Substanzen, die zur Herstellung der Perfusat-Lösungen dienen, wurden von der Firma Merck, Darmstadt, Deutschland, bezogen.

II.1.2 Lösungen

Krebs-Henseleit-Puffer (Perfusat)

NaCl	126,0 mM
KCl	4,7 mM
NaHCO ₃	24,0 mM
CaCl ₂	1,25 mM
MgCl ₂	0,6 mM
KH ₂ PO ₄	1,2 mM
Glucose	5,5 mM
Natriumpyruvat	0,3 mM
Insulin	5 U/l.

Begast mit 94,4% O₂ und 5,6% CO₂ betrug der pH der Lösung 7,35-7,45.

Tyrode- Lösung

NaCl	137,0 mM
KCl	2,6 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1,0 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	3,0 mM
TRIS	1,0 mM

Glucose 0,1%

Der pH betrug 7,38-7,42.

Zur Herstellung der **Omapatrilat-Stammlösung** (1mM) wurde 0,42% NaHCO₃-Lösung verwendet.

ANP, Captopril, Bradykinin und HOE 140 wurden in aqua bidest. gelöst, **pro-ANP [1-30]** wurde in 0,1% Albuminlösung in aqua bidest. gelöst.

Alle Lösungen wurden täglich frisch angesetzt. Lediglich die Tyrode-Lösung wurde gekühlt gelagert und für Versuchsreihen innerhalb von ein bis zwei Wochen verwendet.

II.1.3 Versuchstiere

Die für die Versuche verwendeten, vorwiegend männlichen Meerschweine (Hsd Poc. DH) wogen zwischen 190g und 340g und entstammten zum größten Teil aus der Versuchstierzucht Harlan Winkelmann GmbH (Borchen, Deutschland). Einige Tiere stammten aus der Eigenzucht.

Für die Versuche mit Ratten wurden ausschließlich männliche, 250g - 400g schwere Wistar-Albino-Ratten aus der Eigenzucht (Stammzucht Harlan Winkelmann GmbH) verwendet.

Die Tiere erhielten, den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes entsprechend, eine Standarddiät mit Trockenfutter; Wasser stand ihnen zur freien Verfügung. Sowohl Ratten als auch Meerschweinchen wurden in einem regelmäßigen, ca. 12 stündigen Tag-/Nachtrhythmus in den Tierställen gehalten.

II.2 Tierexperimenteller Teil

II.2.1 Herzpräparation

Die Ratten wurden im Vorfeld der Versuche mit Ether narkotisiert. Zur Organentnahme wurden die Tiere (sowohl Ratten als auch Meerschweinchen) mittels eines Federbolzens durch Nackenschlag getötet, bevor sie auf eine spezielle Versuchstierhalterung gespannt und durch Anschneiden der Aa. Carotides teilweise entblutet wurden. Nun folgte die rasche Eröffnung des Thorax, um unverzüglich durch Überspülen mit 4°C kalter 0,9%-iger NaCl Lösung das noch schlagende Herz zum Stillstand zu bringen. Die Rippen, Sternum, Lungen und Thymus wurden großzügig reseziert, das Perikard entfernt und die Aorta freipräpariert. Durch Anschneiden der Aorta ascendens und Unterfahung mit einem Faden konnte nun die Aortenkanüle mit 37°C warmem Perfusat in diese eingebunden werden, worauf die Herzen spontan wieder zu schlagen begannen. So betrug die Ischämiedauer bis zur erneuten Perfusion jeweils nur wenige Minuten.

Die Aorta wurde im Weiteren nun ganz durchtrennt, wie auch die A. pulmonalis, die Vv. pulmonales, die V. azygos und die Vv. cavae freipräpariert und durchtrennt wurden. Das jetzt mobilisierte Herz wurde dem Thorax entnommen und nach Entfernung des flexiblen Verlängerungsschlauches der Aortenkanüle direkt an die Perfusionsapparatur angeschlossen. Vor der weiteren Präparation bzw. dem Einbringen der jeweiligen Kanülen wurden nun übrige Gewebsreste entfernt und die ab- und zuführenden Gefäße dargestellt.

II.2.2 Langendorff – Modell

Die Methode des isoliert perfundierten Säugetierherzens wurde erstmals 1895 von Oskar Langendorff beschrieben (Langendorff 1895). Seitdem ist diese Methode ein etabliertes und anerkanntes Verfahren zur Untersuchung vielfältiger Sachverhalte und Funktionsweisen des Herzens. Von Döring und Dehnert wurde 1987 eine Modifizierung des ursprünglichen Modells nach Langendorff beschrieben (Döring & Dehnert, 1987), die heute vorzugsweise, so auch in den nachfolgenden Versuchen, verwendet wird.

Bei der Langendorff-Versuchsanordnung handelt es sich prinzipiell um ein isoliert schlagendes Herz, das mit Blut oder einer entsprechenden anderen Flüssigkeit, die jeweils mit Sauerstoff begast, über die Aorta retrograd perfundiert wird. Durch den retrograden Perfusionsfluss, der über die eingebrachte Aortenkanüle in den proximalen Anteil der Aorta ascendens geleitet wird, sind die Taschenklappen der Aorta geschlossen und das Perfusat kann zur Versorgung des Myokards in die Koronararterien fließen (orthograd). Aus dem venösen Schenkel des Koronarsystems fließt das Perfusat nun in den Sinus coronarius und von dort weiter in den rechten Vorhof und Ventrikel. Aus diesem führt die A. pulmonalis das Perfusat als Koronareffluat ab.

Der auf den geschlossenen Aortenklappen lastende Druck kann je nach Höhe der Perfusatflüssigkeitssäule reguliert werden. Die Herzen in diesen Versuchen wurden stets mit einem hydrostatischen Druck von 100 cm H₂O perfundiert (druckkonstante Langendorff-Perfusion). Für dieses Modell wurden die V. azygos, die Vv. Cavae, sowie die Vv. pulmonales zugebunden und in den Pulmonalarterienstumpf eine Kanüle eingebunden, über welche das koronarvenöse Effluat abgeleitet, mit Hilfe eines Flussmessers quantitativ bestimmt, und für weitere analytische Zwecke gesammelt werden konnte.

II.2.3 Arbeitendes Herz

Die Präparation der arbeitenden Herzen wurde in Anlehnung an die von Rigler (1931) und Heubner und Mancke (1935) beschriebene Methode vorgenommen (Döring & Dehnert, 1987). Abweichend von der Langendorff-Präparation, werden die Pulmonalvenen-mündungen durch Inzision miteinander verbunden und kanüliert. Über diese Kanüle kann das Herz nun antegrad über den linken Vorhof perfundiert und über einen vorgeschalteten Einstromwiderstandsregler die Vorlast eingestellt werden. Das Herz wirft ein linksventrikuläres Schlagvolumen in die Aorta aus, verrichtet also Druck-Volumen-Arbeit wie *in vivo*. Die Versorgung der Koronarien verläuft nun wie *in situ* aus der Aorta, vorwiegend während der Diastole. Des Weiteren kann über den Aortenüberlauf und einen Ausstromwiderstand der geförderte Aortenfluss unter Regelung der Nachlast ablaufen. Zusätzlich zum Modus des arbeitenden Herzens kann über ein Umlenkventil wahlweise in den Langendorff-Modus gewechselt werden, und zwar entweder in Form einer druckkonstanten Perfusion, oder in eine, ebenfalls retrograde, flusskonstante Perfusion über eine Peristaltikpumpe.

II.2.4 Versuchsapparatur

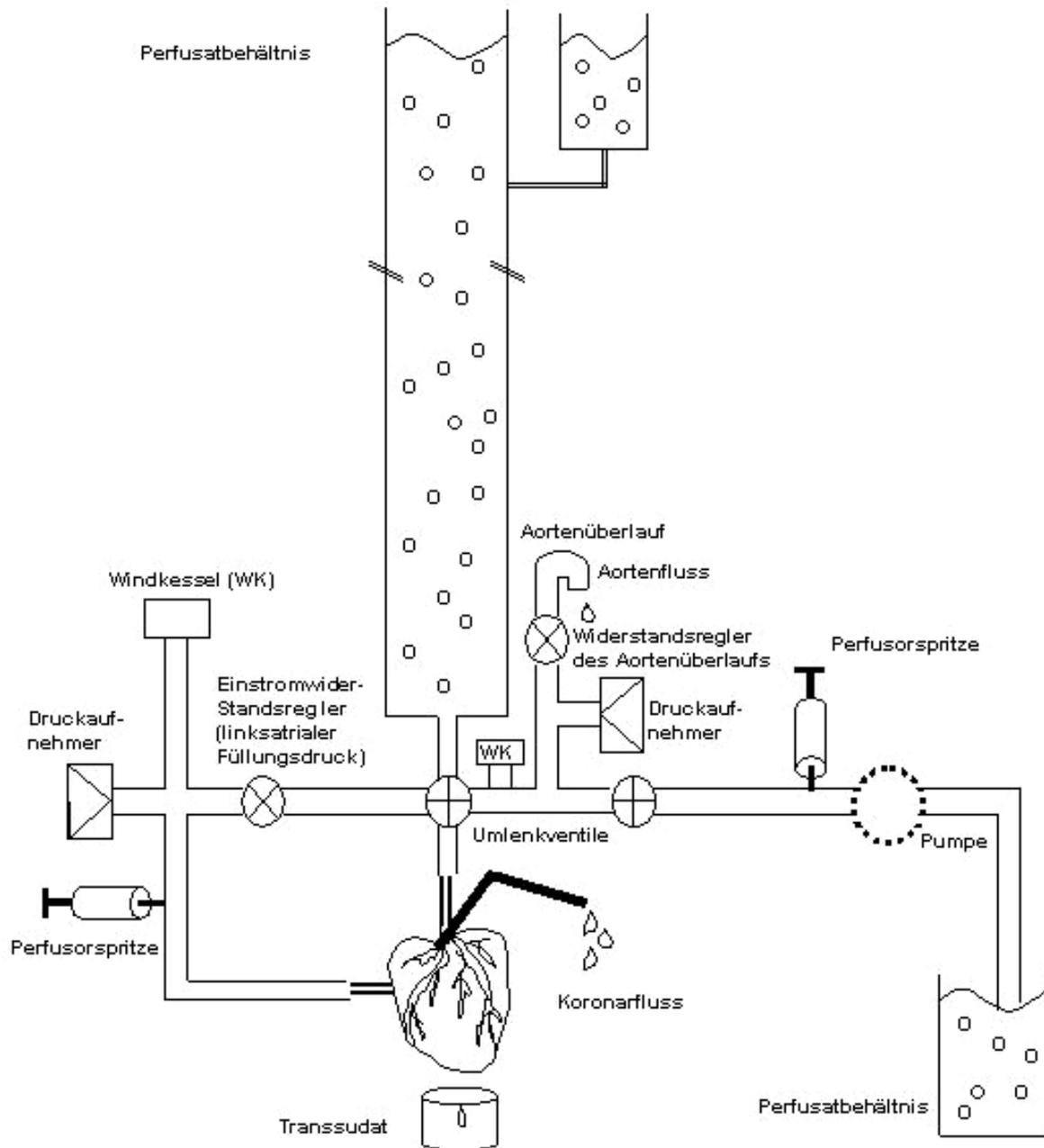


Abb. II.1: Perfusionsapparatur

Abb. II.1 zeigt die Versuchsanordnung, mit der die Herzen wahlweise nach dem Langendorff-Modus retrograd über die Aorta entweder druckkonstant, oder mit Hilfe einer Peristaltikpumpe flusskonstant, oder als arbeitendes Präparat antegrad über den linken Vorhof perfundiert werden können. Die Apparatur besteht im Wesentlichen aus einem Vorratsbehälter für Perfusat, der mit einem Zylinderrohr kommuniziert, sowie einem weiteren Behälter, der das Perfusat für die flusskonstante Perfusion enthält. Jedem dieser drei Perfusatbehälter wurde ein Gemisch aus 94,4% O₂ und 5,6% CO₂ zugeführt. Die Begasung erfolgte über eine Gasmischpumpe (K. Wösthoff OHG, Bochum, Deutschland). Mittels einer Thermostat-Wärmepumpanlage (Colora Messtechnik GmbH, Lorch/Württemberg, Deutschland) wurde das Perfusat auf eine Temperatur von 37°C erwärmt.

Zum Wechsel zwischen Langendorff und arbeitendem Modus dient ein Umlenkventil, das Aortenkanüle, Zylinderrohr und den Zustrom zur Kanüle im linken Vorhof verbindet. Während der flusskonstanten Reperfusion wurden 5 ml/min aus dem Perfusatbehälter über eine Peristaltikpumpe (MS-1 Reglo/8-160; Ismatec Laboratoriumstechnik, Glattbrugg-Zürich, Schweiz) durch die Aortenkanüle retrograd ins Herz befördert.

Die Vorlast bei den arbeitenden Herzen konnte über einen stufenlos regulierbaren Einstromwiderstand verändert werden und lag bei ca. 11-13 cmH₂O, ungefähr 8,5-10 mmHg entsprechend. Der Aortendruck wurde ebenfalls über einen stufenlos regulierbaren Widerstandsregler auf ca. 80 cmH₂O (62 mmHg) eingestellt.

II.3 Versuchsablauf

II.3.1 Arbeitende Meerschweinchenherzen

Nach der Präparation wurden die Meerschweinchenherzen erst ca. 30 Minuten im Langendorff-Modus belassen, um sich von eventuellen Arrhythmien erholen zu können. Den weiteren Versuchsablauf zeigt Abb. II.2. Die erste Arbeitsphase W1 erstreckte sich über 25 Minuten, während der eine Vorlast von ca. 12 cmH₂O und eine Nachlast von ca. 80 cmH₂O eingestellt wurde. Die Bestimmung der

hämodynamischen Parameter erfolgte in den letzten Minuten von W1, in denen sich konstante Druckverhältnisse eingependelt hatten.

Für die nun folgende 10-minütige Ischämie wurde sowohl das Einstrom- als auch das Ausstromventil zugedreht und das Herz in 37°C warme Tyrode-Lösung getaucht, um dieses vor Austrocknung zu schützen und eine konstante Temperatur des Organs zu gewährleisten.

Die flusskonstante Reperfusion wurde über die Peristaltikpumpe, die gleichmäßig ein konstantes Volumen von 5 ml/min über die Aortenkanüle ins Herz beförderte, erreicht. An diese Reperusionsphase (15 Minuten) schloss sich die zweite Arbeitsphase W2 über 25 Minuten an, in der nun wieder durch Regulierung des Ein- bzw. des Ausstroms eine Vorlast von 12 cmH₂O und eine Nachlast von 80 cmH₂O erreicht werden sollten. Die Erfassung der hämodynamischen Parameter erfolgte wieder in den letzten Minuten von W2, in denen die Druckverhältnisse meist konstant waren.

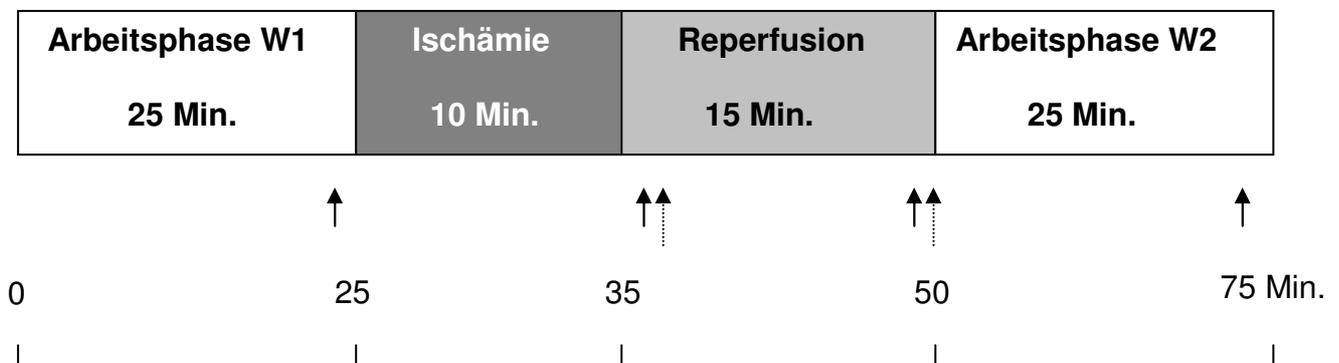


Abb. II.2: Perfusionsprotokoll der Versuche mit arbeitenden Meerschweinchenherzen

Zeitpunkte der Probenentnahmen:

Laktat und Pyruvat-Proben: ↑ Ende W1, Beginn und Ende der Reperfusion, Ende W2

Transsudat: ↑ Beginn und Ende der Reperfusion, jeweils für drei Minuten.

II.3.2 Rattenherzen im Langendorff-Modus

Die Rattenherzen wurden nach der Präparation ebenfalls für etwa 20 Minuten in einer Einschlagphase im Langendorff-Modus belassen. Daraufhin begann der eigentliche Versuchsablauf mit einer 30-minütigen Langendorff-Phase, der eine 15-minütige Ischämie folgte, in der die Herzen in 37°C warme Tyrode-Lösung gebadet wurden. Die daran anschließende Reperfusionphase dauerte 120 Minuten (siehe Abb. II.3). Der Aortenperfusionsdruck wurde bei allen Versuchen durch regelmäßiges Auffüllen des Perfusatbehältnisses konstant auf ca. 100 cmH₂O gehalten.

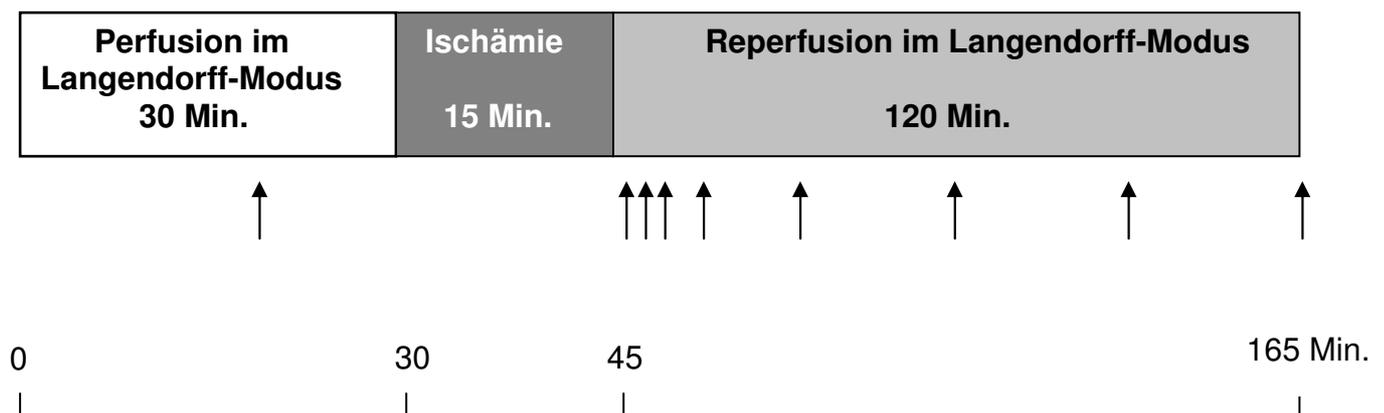


Abb. II.3: Perfusionsprotokoll der Versuche mit Rattenherzen im Langendorff-Modus

Zeitpunkte der Probenentnahmen: ↑

Transsudate: 20. Minute der Perfusion; 1., 5., 10., 15., 30., 60., 90., 120. Minute der Reperfusion

Koronareffluat: zeitgleich mit der Transsudat-Sammlung.

II.3.3 Meerschweinchenherzen im Langendorff-Modus

Die Versuche mit pro-ANP wurden am Meerschweinchenherzen im Langendorff-Modus durchgeführt.

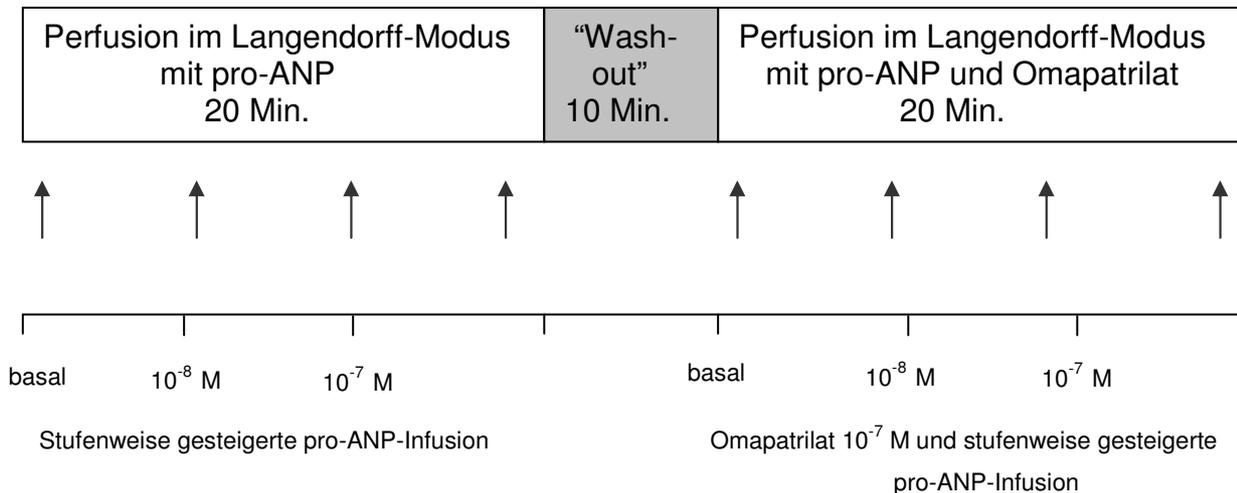


Abb. II.4: Perfusionsprotokoll für Meerschweinchenherzen, die mit pro-ANP und Omapatrilat (10^{-7} M) im Langendorff-Modus behandelt wurden.

Zeitpunkte der Probenentnahmen: ↑ alle fünf Minuten jeweils Transsudat und Koronareffluat.

II.3.4 Probenentnahme und Lagerung

Die Zeitpunkte der Probenentnahmen wurden unter II.3.1. - II.3.3 schon im Zusammenhang mit den Perfusionsprotokollen erwähnt. Die Proben wurden jeweils in Eppendorf-Gefäßen gesammelt, bis zum Ende des jeweiligen Versuches auf Eis gestellt und anschließend bis zur Analyse bei -80°C gelagert.

II.3.5 Zugabe der Substanzen

Je nach Perfusionsmodus wurden die Substanzen mittels einer Spritze und einem Perfusor (Precidor HT, Infors AG, Basel, Schweiz) entweder direkt in die zuleitende Kanüle im linken Vorhof (arbeitendes Herz), über den zuführenden Schlauch der Peristaltikpumpe (flusskonstante Perfusion) oder direkt in die Aortenkanüle (druckkonstanter Langendorff-Modus) appliziert.

II.4 Analytik

II.4.1 Hämodynamische Parameter

Flussmessungen

Die Messung des Aortenflusses [ml/min] und des Koronarflusses [ml/min] erfolgte über ein Ultraschall-Flussmessgerät (T206, Transonic Systems Inc., Ithaca, USA).

Aortendruck und linksatrialer Füllungsdruck

Sowohl der Aortendruck [cmH₂O], als auch der linksatriale Füllungsdruck [cmH₂O] wurden über Druckabnehmer (Model 1050 BP, UFI Morro Bay, CA, USA) und Signalverstärker mit dazugehörigem Programm (Mac Lab/8c, ADInstruments, Pty. Ltd., Australia) aufgezeichnet.

Dazu waren beide Druckabnehmer auf Herzbasisniveau positioniert.

Transsudatmessungen

Die Transsudate wurden jeweils in Eppendorf-Gefäßen über einen definierten Zeitraum (1.-3. min.) gesammelt und danach gewogen [g/min].

II.4.2 Biochemische Parameter

Bestimmung des Sauerstoffgehaltes

Zur Bestimmung des Sauerstoffgehaltes des Perfusats stand ein Blutgasanalysegerät (Rapid lab 248, Chiron Diagnostics GmbH, Niederlassung in Fernwald, Deutschland) zur Verfügung. Damit konnten sowohl der pH-Wert, der PO₂, als auch der PCO₂ bestimmt werden.

ELISA – Tests

TNF α -ELISA: TNF- α in Proben aus Rattenherzen wurde mit dem ELISA-Kit Rat TNF- α ultrasensitive, Biosource, Nivelles, Belgien, gemessen. Die Vorgehensweise entsprach den Angaben des Herstellers.

Pro ANP [1-30]-EIA: Es wurde das Meßsystem der Firma Biomedica GmbH, Wien, Österreich, verwendet. Der EIA-Test wurde nach dem vorgeschlagenen Protokoll des Herstellers durchgeführt.

cGMP-EIA: Die cGMP-Messungen bei Proben aus Meerschweinchenherzen wurde mittels eines BIOTRAK Enzymimmunoassay (EIA) Systems (amersham pharmacia biotech, UK), dem Protokoll Nr. 2 (für Plasma-, Gewebe- und Zellkulturproben) der Herstelleranleitung folgend, durchgeführt.

RIA-Auswertung

Ratten α -ANP [1-28] wurde in den von uns gewonnenen Proben in einem Radioimmunassay direkt von der Firma Immundiagnostik AG, Bensheim bestimmt.

HPLC – Verfahren

Pyruvat und Laktat der Herzen wurde mittels HPLC-Messverfahren ermittelt (Becker & Möbert 1999).

Pumpe: Merck, Hitachi L-6200
Probengeber: Waters 717+, Autosampler
UV-Detektor: Merck, Hitachi L-7400

II.4.3 Berechnete Parameter

Herzfrequenz (HR) [min⁻¹]

Die Herzfrequenz wurde automatisch über den Druckaufnehmer und die damit registrierten Druckspitzen pro Minute im Mac Lab-Programm errechnet.

Ejektionszeit (t_e) [sec]

Die Ejektionszeit beschreibt die Zeit vom beginnenden linksatrialen Druckanstieg bis zum Schluss der Aortenklappe, der als deutliche Inzisur in der Druckkurve zu sehen ist.

Äußere Herzarbeit (EHW) [$\text{mJ} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$]

Die äußere Herzarbeit (EHW = external heart work) lässt sich aus der Summe der vom linken Ventrikel geleisteten Druck-Volumenarbeit (PVW = pressure - volume-work) und Beschleunigungsarbeit (AW = acceleration work), multipliziert mit der Herzfrequenz (HR = heart rate) errechnen.

$$\text{EHW} = (\text{PVW} + \text{AW}) \cdot \text{HR}$$

Die Druck-Volumen-Arbeit pro Schlag (Schlagarbeit) wird als Produkt aus Schlagvolumen ($\text{SV} = \text{HMV} / \text{HF}$) und der Differenz aus mittlerer Druckentwicklung im linken Ventrikel (mittlerer Aortendruck P_{ao}) und linksventrikulärem Füllungsdruck (LVFP = left ventricular filling pressure) errechnet.

$$\text{PVW} = (\text{HMV} / \text{HR}) \cdot (P_{\text{ao}} - \text{LVFP})$$

Die Beschleunigungsarbeit pro Schlag wird mit Hilfe der Formel für kinetische Energie ($E_{\text{kin}} = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2$) errechnet, wobei sich m aus dem Produkt aus Schlagvolumen und der Perfusatsdichte ρ zusammensetzt und v aus dem Quotienten aus Schlagvolumen und dem Quadrat aus $\pi \cdot r^2 \cdot t_e$ ($\rho = 1,005 \text{g/cm}^3$; $r =$ minimaler Radius der Aortenkanüle = 0,15 cm, $t_e =$ Ejektionsdauer).

$$\text{AW} = \frac{1}{2} \cdot (\text{SV} \cdot \rho) \cdot [\text{SV} \cdot (\pi \cdot r^2 \cdot t_e)^{-2}]^2$$

Die berechneten Werte der äußeren Herzarbeit werden in [$\text{mJ} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$] angegeben. Die Maßeinheit g bezeichnet hier das korrigierte Feuchtgewicht des Herzens, wobei dieses aus dem Trockengewicht errechnet wurde, in der Annahme, dass das Trockengewicht eines *ex vivo* perfundierten Meerschweinchenherzens 14%

des Feuchtgewichts beträgt. Zur Trocknung wurden die Herzen bei 60-80°C über die Dauer von ca. 48 Stunden im Ofen belassen.

Postischämische Erholung des Herzminutenvolumens bzw. der äußeren Herzarbeit

Die postischämische Erholung sowohl des Herzminutenvolumens als auch der äußeren Herzarbeit wurde jeweils als prozentuales Verhältnis der post- zu prä-ischämischen Werte angegeben und diente zur Quantifizierung des Ischämie-/Reperfusionsschadens.

Erholung = postischämisch/präischämisch · 100 [%]

Effizienz der Herzarbeit [%]: EHW/MVO₂

Die Effizienz der Herzarbeit entspricht dem Quotienten aus der äußeren Herzarbeit (EHW) und dem Sauerstoffverbrauch (MVO₂).

Sauerstoffbilanz:

Das O₂-Angebot, der O₂-Verbrauch, sowie die O₂-Extraktion lassen sich anhand der gemessenen Sauerstoffpartialdrücke (PO₂) in Perfusat und koronarvenösem Effluat ermitteln:

$$\text{O}_2\text{-Verbrauch} [\mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}] = (\text{PO}_2 \text{ Perfusat} - \text{PO}_2 \text{ koronarvenös}) \cdot \text{O}_2\text{-Löslichkeit} \cdot \text{CF}$$

Die O₂ -Löslichkeit wird anhand des Bunsenschen Löslichkeitskoeffizienten α für O₂ in Wasser bei 37°C und 760 mmHg berechnet ($\alpha = 0,024\text{ml O}_2 / \text{ml H}_2\text{O}$).

$$\text{O}_2\text{-Angebot [in } \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}] = \text{PO}_2 \text{ Perfusat} \cdot \text{O}_2\text{-Löslichkeit} \cdot \text{CF}$$

$$\text{O}_2\text{-Ausschöpfung [\%]} = [(\text{PO}_2 \text{ Perfusat} - \text{PO}_2 \text{ koronarvenös}) \cdot \text{PO}_2 \text{ Perfusat}^{-1}] \cdot 100$$

$$\text{Pyruvatverbrauch [nmol/min]} = (300 - \text{Pyruvatfreisetzung}) \cdot \text{Koronarfluss}$$

$$\text{Laktat/Pyruvat-Quotient} = \text{Laktatfreisetzung/Pyruvatverbrauch}$$

II.4.4 Statistische Programme und Auswertung

Die Auswertung und Darstellung der Ergebnisdaten erfolgte mit Hilfe der Programme Microsoft Excel, Jandel Sigma Stat 1.0 und Sigma-Plot 5.0.

Die Daten werden jeweils als Mittelwert (MW) mit dem zugehörigen Standardfehler (\pm SEM) angegeben bzw. in den Diagrammen dargestellt. Zur statistischen Auswertung der Gruppen untereinander wurde, bei Normalverteilung der Werte der Student t-Test, bzw. innerhalb der Testgruppen der t-Test für verbundene Stichproben (paired t-test) herangezogen. In Fällen ohne Normalverteilung wurden der Mann-Whitney-Rank-Sum-Test, bzw. der Wilcoxon Signed Rank Test angewandt. Der Vergleich aller Gruppen gegen die jeweilige Kontrollgruppe erfolgte mittels der Bonferroni-Methode für multiple Testanwendung. Zur gleichzeitigen Untersuchung zweier Parameter bei verschiedenen Gruppen (z.B. Behandlung und Zeitpunkt), diente der Two Way RM ANOVA-Test. Vergleiche mit $p < 0,05$ wurden als signifikant bezeichnet und in Abbildungen mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

III. Ergebnisse

III.1 Omapatrilat - Wirkung auf die postischämische Herzfunktion arbeitender Meerschweinchenherzen

Um die Möglichkeit einer kardioprotektiven Wirkung von Omapatrilat auf isoliert arbeitende Meerschweinchenherzen nach globaler Ischämie zu eruieren und die daran beteiligten Mechanismen zu klären, wurden sieben Versuchsgruppen aufgestellt:

	Behandlung	Versuchsanzahl
Gruppe 1	Kontrollen	n=7
Gruppe 2	Omapatrilat 10^{-7} M (OMAP 10^{-7} M)	n=7
Gruppe 3	Omapatrilat 10^{-8} M (OMAP 10^{-8} M)	n=5
Gruppe 4	Omapatrilat 10^{-7} M, postischämisch (OMAP 10^{-7} M p)	n=6
Gruppe 5	Omapatrilat 10^{-7} M + HOE 140 (OMAP + HOE)	n=6
Gruppe 6	ANP 10^{-9} M	n=7
Gruppe 7	Captopril 10^{-7} M (CAPT 10^{-7} M)	n=7

Tabelle III.1: Übersicht der einzelnen Versuchsgruppen

Die erste Gruppe wurde von den Kontrollherzen gebildet. Diese durchliefen das Perfusionsprotokoll, bestehend aus Arbeitsphase W1, 10-minütiger Ischämie, 15 Minuten Reperfusion ohne Druckvolumen-Arbeit und Arbeitsphase W2, ohne Zugabe von Substanzen.

Während der Perfusion der Herzen von Gruppe 2 wurde über die gesamte Zeit des Versuchsablaufes (ausgenommen die 10-minütige Ischämie) Omapatrilat in einer Konzentration von 10^{-7} M zugeführt, was einem Plasmaspiegel im pharmakologisch-therapeutischen Wirkungsbereich entspricht.

Um zu klären, ob auch niedrigere Konzentrationen des Vasopeptidase-Inhibitors bereits zu einem positiven Effekt führen, wurde Gruppe 3 fortlaufend mit 10^{-8} M Omapatrilat perfundiert.

Der Effekt einer ausschließlich postischämischen Applikation von Omapatrilat (10^{-7} M) wurde durch Gruppe 4 ermittelt, indem die Herzen lediglich nach der Ischämiephase d. h. während REP und W2 behandelt wurden.

In der Annahme, dass eine mögliche kardioprotektive Wirkung von Omapatrilat, ähnlich wie bei den ACE-Hemmern, Bradykinin-vermittelt sein könnte, wurde Versuchsreihe 5 durchgeführt. Die Herzen dieser Gruppe erhielten über das ganze Protokoll Omapatrilat (10^{-7} M) und parallel dazu den BK₂-Rezeptorantagonisten HOE 140 in einer Konzentration von 10^{-8} M.

Die Auswirkungen einer Erhöhung der Konzentrationen an natriuretischen Peptiden, wie sie durch Hemmung der neutralen Endopeptidase durch Omapatrilat angenommen werden kann, sollte mit Gruppe 6, zumindest teilweise, imitiert werden. So wurden die Herzen aus Gruppe 6 mit einem Vertreter der natriuretischen Peptide, ANP (10^{-9} M), durchgehend perfundiert.

Zum direkten Vergleich des dualen Vasopeptidase-Inhibitors mit einem selektiven ACE-Hemmer wurde bei Gruppe 7 Captopril in einer Konzentration von 10^{-7} M appliziert. Dieser ACE-Hemmer enthält zudem, ebenso wie Omapatrilat, eine freie Sulfhydrylgruppe. Der Vergleich von Omapatrilat und Captopril in gleicher Konzentration diente also vorrangig zur Klärung der Frage, ob Kardioprotektion durch Omapatrilat eventuell nur mit den antioxidativen Eigenschaften des Moleküls zu begründen wäre.

III.1.1 Funktionelle Parameter

In Tabelle III.2 sind die präischämischen Durchschnittswerte der hämodynamischen Parameter aller Gruppen am Ende der ersten Arbeitsphase W1 dargestellt.

Gruppe	CF(ml/min)	AF(ml/min)	HMV(ml/min)	EHW (mJ/(min))	HF (1/min)
1: Kontrollen	8,5 ± 0,6	29,3 ± 3,1	38,2 ± 3,5	346 ± 32	262 ± 15
2: OMAP 10 ⁻⁷ M	8,6 ± 0,5	23,4 ± 4,6	31,9 ± 4,8	239 ± 36	224 ± 11
3: OMAP 10 ⁻⁸ M	7,8 ± 0,2	28,4 ± 4,6	36,3 ± 4,6	296 ± 58	237 ± 7
4: OMAP 10 ⁻⁷ M p	7,1 ± 0,8	27,4 ± 3,4	34,5 ± 4,0	294 ± 52	223 ± 4 *
5: OMAP + HOE	6,8 ± 0,3 *	30,5 ± 3,0	37,3 ± 3,3	336 ± 26	221 ± 10 *
6: ANP 10 ⁻⁹ M	7,1 ± 0,4	31,2 ± 1,8	38,2 ± 1,8	306 ± 23	211 ± 7 *
7: CAPT 10 ⁻⁷ M	8,1 ± 0,6	25,2 ± 2,9	33,3 ± 3,0	230 ± 20 *	284 ± 22

Tabelle III.2: Hämodynamische Parameter aus Arbeitsphase W1

CF (Koronarfluss), AF (Aortenfluss), HMV (Herzminutenvolumen), EHW (äußere Herzarbeit), HF (Herzfrequenz). (* = p < 0,05 vs. Kontrollgruppe, n = 5-7).

Die präischämischen Ausgangswerte des Aortenflusses und des Herzminutenvolumens zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Obwohl in manchen Vergleichen die Mittelwerte der äußeren Herzarbeit um bis zu 30 % voneinander abwichen, war die EHW nur in den mit Captopril 10⁻⁷ M behandelten Herzen schon präischämisch signifikant niedriger als bei der Kontrollgruppe. In Gruppe 5 (Omapatrilat + HOE) war der Koronarfluss vor Ischämie bereits im Mittel signifikant niedriger als in den Kontrollherzen. Bezüglich der Herzfrequenz lagen präischämisch die Werte in Gruppe 4, 5 und 6 signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe.

Die hämodynamischen Parameter am Ende der zweiten Arbeitsphase W2 nach globaler 10-minütiger Ischämie und flusskonstanter Reperfusion zeigt Tabelle III.3.

Gruppe	CF(ml/min)	AF(ml/min)	HMV(ml/min)	EHW (mJ/(min))	HF (1/min)
1: Kontrollen	6,2 ± 0,5	14,3 ± 2,7	20,6 ± 2,6	187 ± 30	236 ± 10
2: OMAP 10 ⁻⁷ M	7,1 ± 0,5	16,6 ± 3,7	23,7 ± 4,0	186 ± 28	212 ± 9
3: OMAP 10 ⁻⁸ M	5,8 ± 0,4	14,8 ± 4,7	19,6 ± 5,0	173 ± 54	211 ± 16
4: OMAP 10 ⁻⁷ M p	5,3 ± 0,7	11,8 ± 2,4	17,2 ± 2,9	131 ± 28	202 ± 12
5: OMAP + HOE	5,8 ± 0,2	20,3 ± 2,3	25,3 ± 1,9	232 ± 25	220 ± 13
6: ANP 10 ⁻⁹ M	6,2 ± 0,3	20,5 ± 2,4	26,6 ± 2,6	216 ± 28	209 ± 10
7: CAPT 10 ⁻⁷ M	7,5 ± 0,7	12,8 ± 1,1	20,4 ± 1,4	142 ± 13	240 ± 16

Tabelle III.3: Hämodynamische Parameter aus Arbeitsphase W2

CF (Koronarfluss), AF (Aortenfluss), HMV (Herzminutenvolumen), EHW (äußere Herzarbeit), HF (Herzfrequenz); (n = 5-7).

Postischämisch ergaben sich zum Ende der zweiten Arbeitsphase bei Koronarfluss, Aortenfluss, Herzminutenvolumen, äußerer Herzarbeit und Herzfrequenz keine statistisch signifikanten Unterschiede bezogen auf die Kontrollen.

Da sich die präischämischen Ausgangswerte der äußeren Herzarbeit einzelner Herzen doch erheblich unterscheiden, wurden im Weiteren die postischämischen Werte zusätzlich auf ihren präischämischen Ausgangswert bezogen. So konnte die direkte Veränderung nach Ischämie bei den Herzen jeder einzelnen Gruppe verdeutlicht werden.

III.1.1.1 Erholung der äußeren Herzarbeit

In allen Herzen war nach Ischämie ein signifikanter Abfall der äußeren Herzarbeit zu sehen. Den bedeutendsten funktionellen Parameter zur Beurteilung des postischämischen Reperfusionsschadens stellt jedoch die prozentuale Erholung der äußeren Herzarbeit in der Arbeitsphase W2, bezogen auf präischämische Ausgangswerte der Arbeitsphase W1, dar.

In der Kontrollgruppe betrug die postischämische Erholung $52,4 \pm 6,9$ %. Die Herzen der mit Omapatrilat (10^{-7} M) behandelten Gruppe erreichten eine signifikante Verbesserung auf $78,4 \pm 2,6$ %. Weder eine Verabreichung von Omapatrilat in niedrigerer Konzentration (10^{-8} M), noch die Gabe erst mit Beginn der Reperfusion ließen einen kardioprotektiven Effekt auf die äußere Herzarbeit sichtbar werden (prozentuale Erholung $50,7 \pm 8,1$ % bzw. $49,9 \pm 5,7$ %).

Herzen, die mit Omapatrilat (10^{-7} M) zusammen mit dem selektiven Bradykinin-(BK₂)-Rezeptor-Antagonisten HOE 140 behandelt wurden, sowie die mit exogenem ANP (10^{-9} M) behandelte Gruppe, erreichten etwa eine gleiche prozentuale Erholung ($68,9 \pm 5,0$ % bzw. $69,1 \pm 5,0$ %). Diese Werte überstiegen zwar die der Kontrollgruppe deutlich, aufgrund der starken Streuung der Einzelwerte ergab sich hier jedoch keine statistisch signifikante Verbesserung ($p = 0,08$ bzw. $0,07$ vs. Kontrollen).

Interessanterweise brachte die Behandlung mit dem selektiven ACE-Hemmer Captopril (10^{-7} M) keine eindeutige Verbesserung im Vergleich zu den Kontrollen. Folglich reicht die Anwesenheit einer antioxidativen SH-Gruppe im Molekül nicht alleine aus, um den funktionellen Reperfusionsschaden zu vermindern. In Abbildung III.1 ist eine Übersicht über die prozentuale Erholung der äußeren Herzarbeit aller Gruppen wiedergegeben.

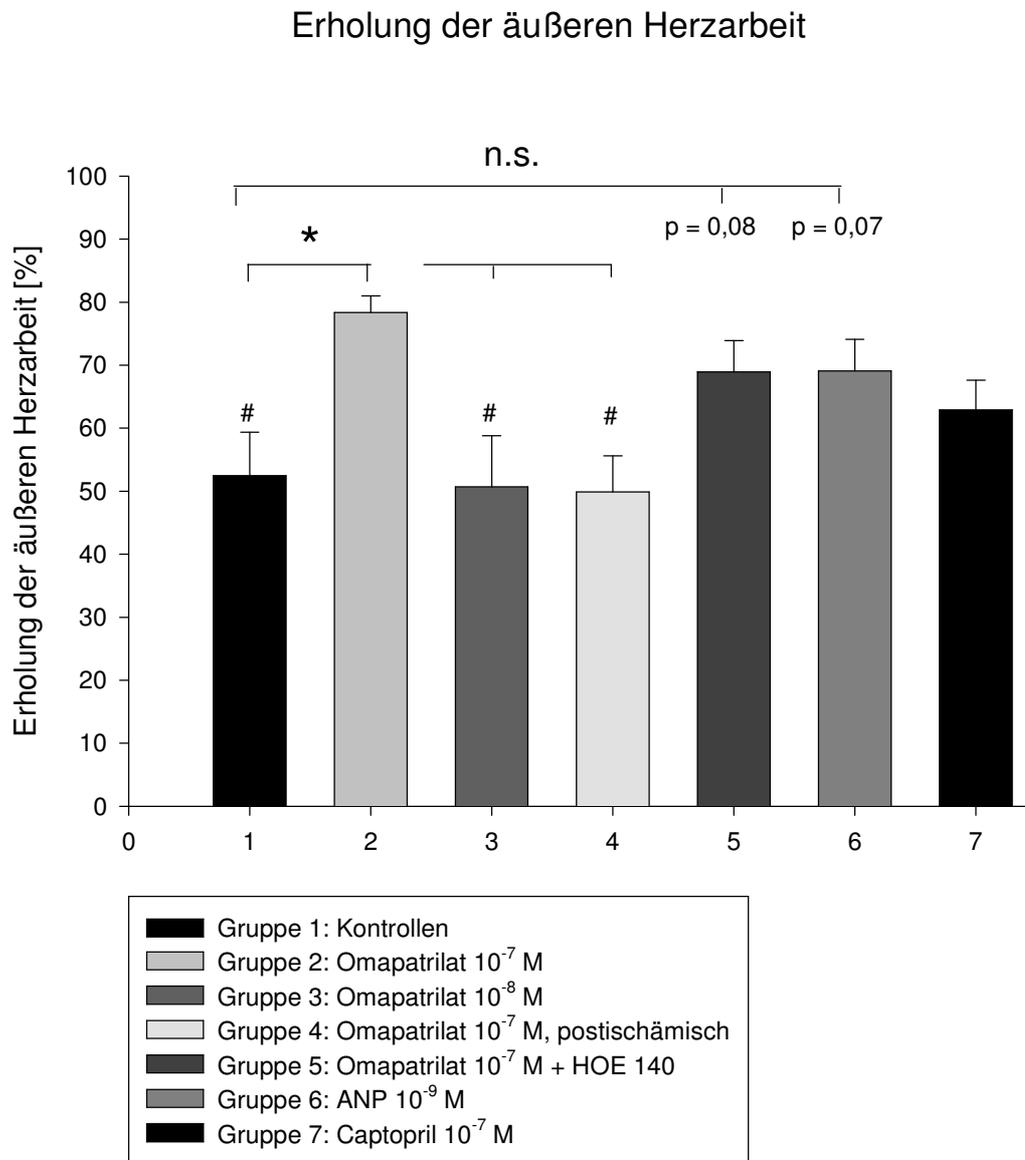


Abb. III.1: Prozentuale Erholung der äußeren Herzarbeit (Meerschweinchenherzen)

Die prozentuale Erholung stellt den Anteil der äußeren Herzarbeit in Arbeitsphase W2 im Vergleich zur präischämischen Arbeitsphase W1 (= 100 %) dar; (* = $p < 0,05$ vs. Kontrollen; # = $p < 0,05$ vs. Omapatrilat; n. s. = nicht signifikant; $n = 5-7$).

III.1.1.2 Koronarvenöser Fluss

Die Messung des Koronarflusses erfolgte jeweils am Ende der ersten und zweiten Arbeitsphase (W1 und W2). Dabei nahm der Koronarfluss in allen Versuchsgruppen postischämisch signifikant ab. Zu erwähnen ist die Omapatrilat + HOE-Gruppe (Gruppe 5), die bereits präischämisch signifikant niedrigere Ausgangswerte lieferte (Abb III.2).

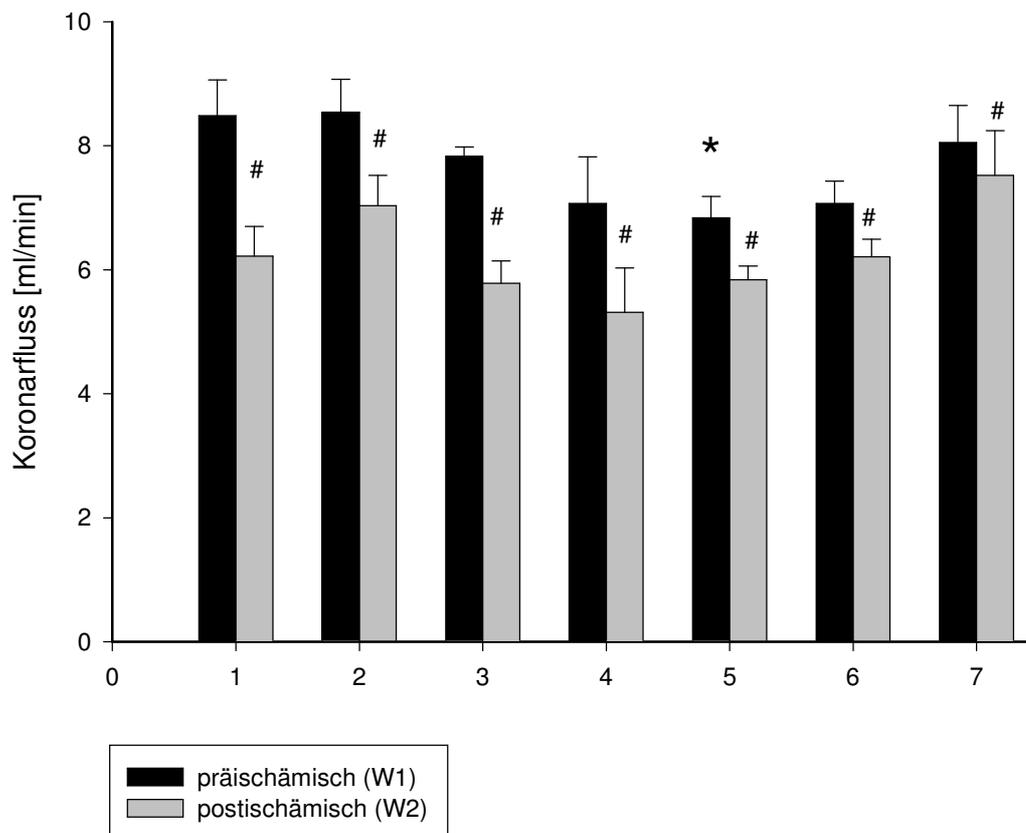


Abb. III.2: Koronarvenöser Fluss in der prä- und postischämischen Arbeitsphase

1: Kontrollen, 2: Omapatrilat 10^{-7} M, 3: Omapatrilat 10^{-8} M, 4: Omapatrilat 10^{-7} M, postischämisch, 5: Omapatrilat 10^{-7} M + HOE, 6: ANP 10^{-9} M, 7: Captopril 10^{-7} M; (* = $p < 0,05$ vs. Kontrollen; # = $p < 0,05$ vs. präischämisch; $n = 5-7$).

Um den Abfall des Koronarflusses der einzelnen Gruppen nach Ischämie besser zu verdeutlichen und unter den Gruppen vergleichen zu können, ist diese Abnahme in

Abb. III.3 als Prozentangabe, d. h. bezogen auf den jeweiligen Wert der ersten Arbeitsphase W1, wiedergegeben. Hierbei ist in der Omapatrilat (10^{-7} M) - Gruppe ein geringerer Abfall des Koronarflusses zu sehen als bei den Kontrollen. In Gruppe 5 (Omapatrilat +HOE), Gruppe 6 (ANP 10^{-9} M) und Gruppe 7 (Captopril 10^{-7} M) fiel der Koronarfluss sogar signifikant weniger ab als in den Kontrollherzen. Herzen, die mit Omapatrilat 10^{-8} M bzw. 10^{-7} M postischämisch behandelt wurden, zeigten ein mit Kontrollen vergleichbares Ergebnis (ca. 25 % Flussabnahme).

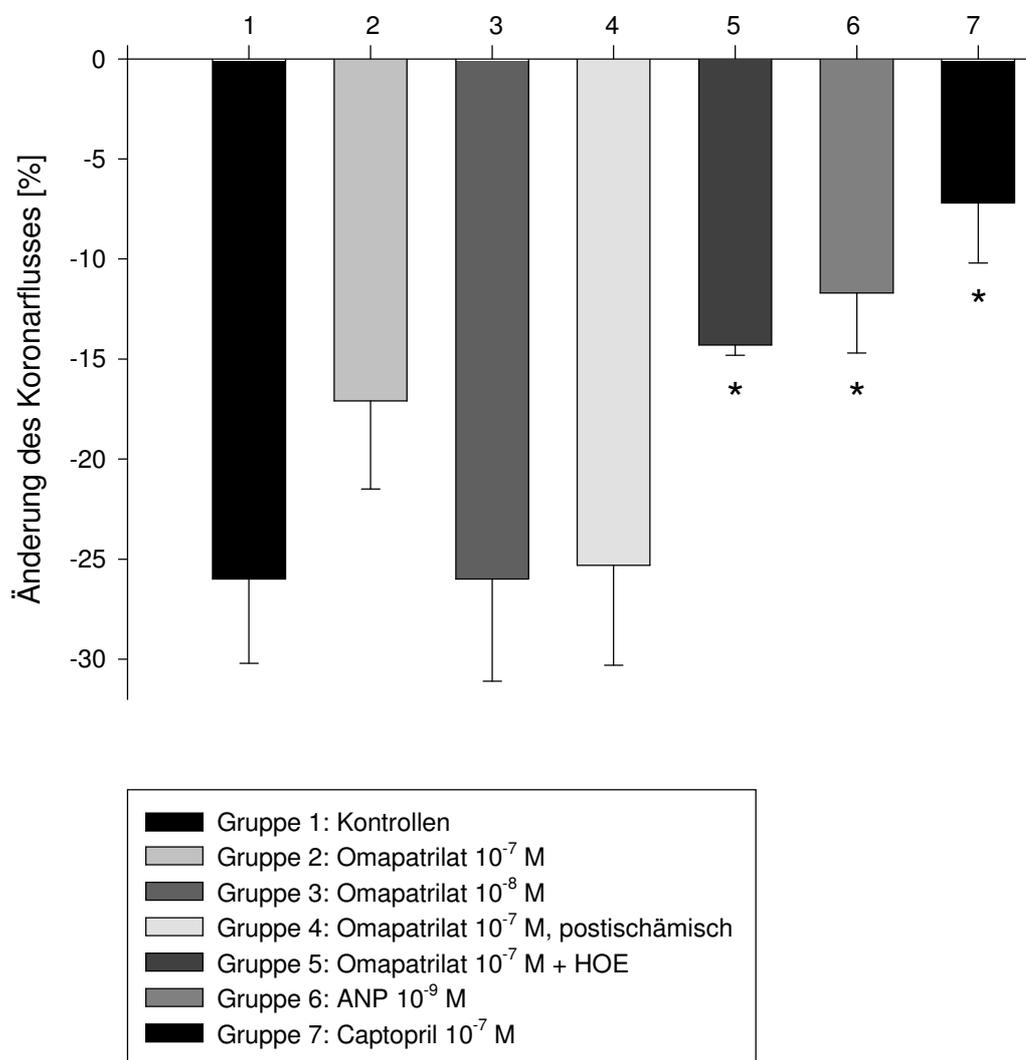


Abb. III.3: Prozentuale Abnahme des Koronarflusses nach Ischämie bezogen auf den jeweiligen Ausgangswert in der ersten Arbeitsphase;

(* = $p < 0,05$ vs. Kontrollen; $n = 5-7$).

III.1.1.3 Transsudatmessungen

Epikardiales Transsudat stellt eine seröse Flüssigkeit dar, die sich im Modell des isoliert perfundierten Herzens an der Herzspitze sammelt, dort abtropft und somit einfach mittels eines Gefäßes aufgefangen und gemessen werden kann. Die Transsudatmenge wird zur Beurteilung der koronaren mikrovaskulären Gefäßpermeabilität (koronare Netto-Filtration) herangezogen.

In den hier beschriebenen Versuchsreihen wurde Transsudat in einer frühen und späten Phase der 15-minütigen, flusskonstanten Reperfusion gesammelt (TS 1: 2.-4. Minute bzw. TS 2: 12.-14. Minute). Die Mittelwerte der einzelnen Gruppen sind in Tabelle III.4 wiedergegeben.

Gruppe	TS 1 [g/min] (2.-4. Minute der Reperfusion)	TS 2 [g/min] (12.-14. Minute der Reperfusion)
1) Kontrollen	0,137 ± 0,035	0,150 ± 0,023
2) OMAP 10 ⁻⁷ M	0,177 ± 0,030 ‡	0,227 ± 0,037#
3) OMAP 10 ⁻⁸ M	0,128 ± 0,016 ‡	0,192 ± 0,024#
4) OMAP 10 ⁻⁷ M, post.	0,147 ± 0,027 ‡	0,217 ± 0,033
5) OMAP 10 ⁻⁷ M + HOE	0,053 ± 0,016	0,094 ± 0,023#
6) ANP 10 ⁻⁹ M	0,149 ± 0,033 ‡	0,318 ± 0,086#,\$
7) Captopril 10 ⁻⁷ M	0,204 ± 0,037 ‡	0,237 ± 0,048

Tabelle III.4: Transsudatmessungen zu einem frühen (2.-4. Minute), sowie späten (12.-14. Minute) Zeitpunkt der Reperfusion

(‡ = p < 0,05 vs. TS1 Gruppe 5, # = p < 0,05 vs. TS1, § = p < 0,05 vs. TS2 Gruppe 5; n = 5-7).

Die Menge des Transsudates nahm in allen Gruppen während der postischämischen Reperfusion zu; in Gruppe 2, 3, 5 und 6 war diese Steigerung signifikant, bezogen auf den Ausgangswert. Bemerkenswert ist zum einen Gruppe 5 (Omapatrilat und HOE), die sowohl einen sehr niedrigen Ausgangswert, als auch eine geringe Transsudatmenge gegen Ende der flusskonstanten Reperfusion zeigt. Im Gegensatz

dazu war bei den mit Omapatrilat, Captopril und im Besonderen bei den mit exogenem ANP behandelten Herzen deutlich gesteigerte Transsudatmenge in der späten Reperfusion zu sehen. Allerdings war die Streuung der Einzelwerte zu groß, um statistische Signifikanz gegen die Kontrollgruppe zu erreichen.

Da die absolute Transsudatmenge jedes einzelnen Herzens möglicherweise auch von der Qualität der Präparation (Gefäßligaturen) abhängt, wurde die Zunahme des Transsudates als Differenz der Absolutwerte in Abb. III.4 dargestellt, um speziell die Veränderung während der Reperfusion deutlich zu machen.

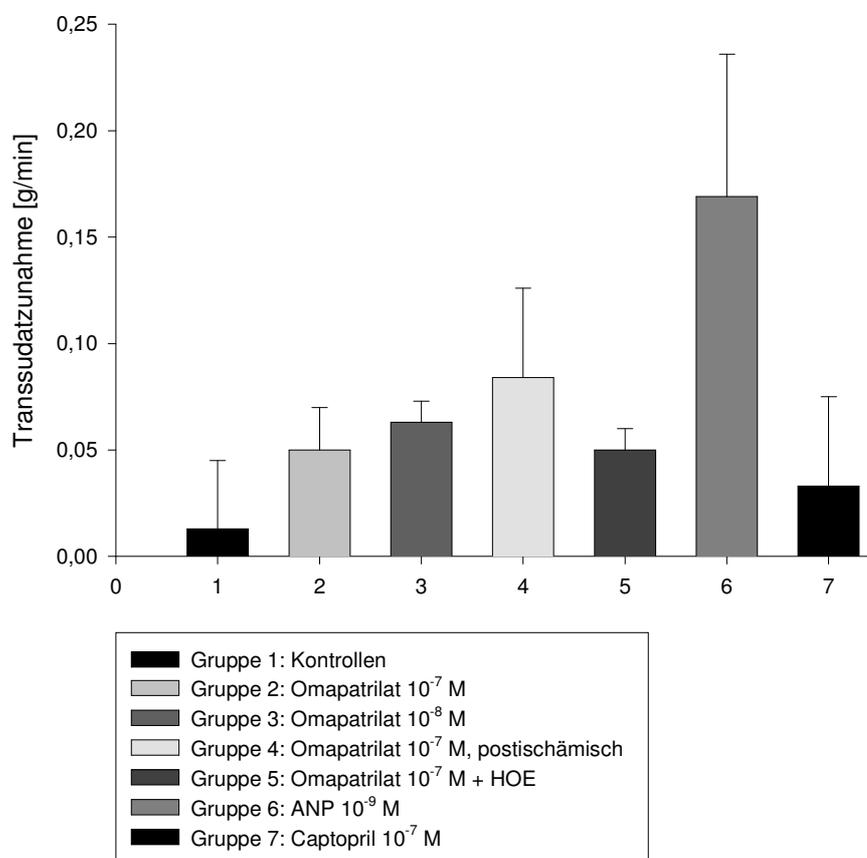


Abb. III.4: Transsudatzunahme während der Reperfusion

(n = 5-7).

Die ANP-Gruppe erreichte nicht nur bei den Absolutwerten, sondern auch bei der Veränderung der Transsudatmenge während der Reperfusion das höchste Niveau, verglichen mit allen anderen Gruppen. Jedoch war der Unterschied nicht statistisch signifikant ($p = 0,057$).

III.1.1.4 Herzfrequenz

Die Herzfrequenz zeigte in allen Gruppen einen postischämischen Abfall (zwischen 1,5 und 17,6%), der jedoch in keiner Gruppe signifikant ausfiel. Auch ein Vergleich der postischämischen Herzfrequenz zwischen Interventionsgruppen und Kontrollen ergab keine Signifikanz. Lediglich die präischämischen Werte der Gruppen 4, 5 und 6 unterschieden sich signifikant gegenüber den Kontrollen. Hierfür gibt es keinen plausiblen Grund.

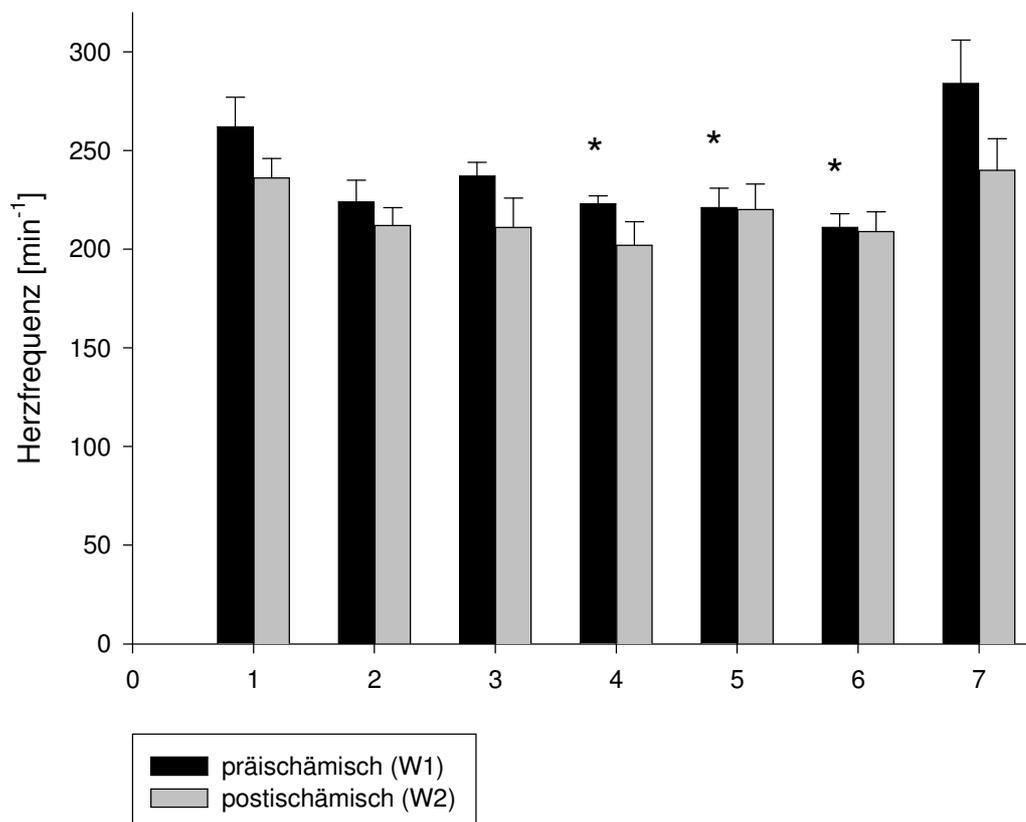


Abb. III.5 : Herzfrequenz in Arbeitsphasen W1 und W2

1: Kontrollen, 2: Omapatrilat 10^{-7} M, 3: Omapatrilat 10^{-8} M, 4: Omapatrilat 10^{-7} M, postischämisch, 5: Omapatrilat 10^{-7} M + HOE, 6: ANP 10^{-9} M, 7: Captopril 10^{-7} M; (* = $p < 0,05$ vs. Kontrollen, $n = 5-7$).

III.1.2 Metabolische und biochemische Parameter

III.1.2.1 Myokardialer Sauerstoffhaushalt

Anhand der in den verschiedenen experimentellen Phasen (W1, Reperfusion und W2) gemessenen Sauerstoffspannung in Perfusat und koronarvenösem Effluat konnten, unter Einbeziehung des jeweiligen Koronarflusses, Angebot, Verbrauch und Ausschöpfung von Sauerstoff berechnet werden (siehe Tabellen III.5 – III.8).

Sauerstoffpartialdruck PO₂ im koronarvenösen Effluat [mmHg]			
Gruppe	Ende W1	Ende der Reperfusion	Ende W2
1: Kontrollen (n=7)	85,4±10,0	50,9± 6,4	94,1±15,9
2: Omapatrilat 10 ⁻⁷ M (n=6)	90,9± 8,0	66,1± 7,8	92,4±13,1
3: Omapatrilat 10 ⁻⁸ M (n=5)	91,7±11,5	73,6±16,0	91,4±10,3
5: Omapatrilat 10 ⁻⁷ M + HOE (n=6)	88,4± 8,4	78,9± 4,7 *	79,3± 6,7
6: ANP 10 ⁻⁹ M (n=6)	89,9±11,8	76,0± 6,9 *	81,7± 6,1
7: Captopril 10 ⁻⁷ M (n=3)	63,6±10,0	60,3± 8,9	88,9±26,3

Tabelle III.5: Sauerstoffpartialdruck PO₂ im koronarvenösen Effluat

(* = p < 0,05 vs. Kontrollen).

myokardiales Sauerstoffangebot [µl/min]			
Gruppe	Ende W1	Ende der Reperfusion	Ende W2
1: Kontrollen (n=7)	144,4± 6,3	85,3±1,6	105,6± 0,9
2: Omapatrilat 10 ⁻⁷ M (n=6)	137,4± 9,4	80,3±3,0	112,4± 6,4
3: Omapatrilat 10 ⁻⁸ M (n=5)	124,0± 2,3	79,2±1,1 *	91,8±6,4
5: Omapatrilat 10 ⁻⁷ M + HOE (n=6)	107,7±13,1 *	79,0±6,5	92,3±10,9
6: ANP 10 ⁻⁹ M (n=6)	124,1± 5,6	88,0±4,9	108,3± 2,5
7: Captopril 10 ⁻⁷ M (n=3)	110,0± 6,2	83,5±0,2	98,2± 0,6

Tabelle III.6: Das myokardiale Sauerstoffangebot entspricht dem Produkt aus O₂-Gehalt des oxygenierten (PO₂ = 600-630mmHg) Perfusats und dem Perfusatfluss (Koronarfluss);

(* = p < 0,05 vs. Kontrollen).

myokardialer Sauerstoffverbrauch MVO₂ [µl/min]			
Gruppe	Ende W1	Ende der Reperfusion	Ende W2
1: Kontrollen (n=7)	97,5± 0,3	88,1± 0,3	94,5± 3,7
2: Omapatrilat 10 ⁻⁷ M (n=6)	87,1± 1,6	77,6± 3,1 *	86,7± 2,7
3: Omapatrilat 10 ⁻⁸ M (n=5)	87,9± 0,5	77,1± 5,3 *	86,9± 2,2
5: Omapatrilat 10 ⁻⁷ M + HOE (n=6)	88,3±14,8	75,9±11,6	89,1±11,8
6: ANP 10 ⁻⁹ M (n=6)	100,5± 6,3	87,0± 6,9	101,1± 8,6
7: Captopril 10 ⁻⁷ M (n=3)	96,8± 5,6	84,4±1,7	92,1± 0,2

Tabelle III.7: Myokardialer Sauerstoffverbrauch (* = p < 0,05 vs. Kontrollen).

myokardiale Sauerstoffausschöpfung [%]			
Gruppe	Ende W1	Ende der Reperfusion	Ende W2
1: Kontrollen (n=7)	84,0±2,1	90,5±1,4	82,4±2,9
2: Omapatrilat 10 ⁻⁷ M (n=6)	81,7±1,4	86,8±1,5	81,7±2,0
3: Omapatrilat 10 ⁻⁸ M (n=5)	81,7±2,4	85,2±3,7 *	81,7±2,4
5: Omapatrilat 10 ⁻⁷ M + HOE (n=6)	83,5±2,5	83,7±1,6*	84,0±1,1
6: ANP 10 ⁻⁹ M (n=6)	88,0±2,6	86,2±1,4*	85,6±1,5
7: Captopril 10 ⁻⁷ M (n=3)	89,4±1,9	88,6±1,7	83,2±7,0

Tabelle III.8: Die myokardiale Sauerstoffausschöpfung [%] beschreibt das Verhältnis von O₂-Verbrauch zu O₂-Angebot; (* = p < 0,05 vs. Kontrollen).

Das mittlere Sauerstoffangebot lag bei den verschiedenen Gruppen gegen Ende der ersten Arbeitsphase zwischen 107,7 und 144,4 µl/min. Während der Reperfusion fielen die Werte ab (79,2 – 88,0 µl/min), um gegen Ende der zweiten Arbeitsphase wieder leicht zu steigen (91,8 – 112,4 µl/min).

Einen ähnlichen Verlauf zeigte der myokardiale Sauerstoffverbrauch. Erwartungsgemäß war dieser am Ende der Reperusionsphase niedriger als in der ersten Arbeitsphase (im Durchschnitt um 10% bis 30%); zum Ende der zweiten Arbeitsphase stieg der Verbrauch wieder auf das präischämische Niveau.

Die Sauerstoffausschöpfung lag durchwegs über 80% und nahm (ausgenommen Gruppe 6) am Ende der Reperfusion höhere Werte an als in W1. In W2 fielen die Werte wieder. Signifikante Unterschiede bezüglich des Sauerstoffverbrauchs bzw.

der Sauerstoffausschöpfung, im Vergleich zu den Kontrollen, ergaben sich jeweils nur in der Reperfusionsphase.

III.1.2.2 Effizienz der Herzarbeit

Die Effizienz der Herzarbeit setzt sich aus dem Quotienten von äußerer Herzarbeit und myokardialen Sauerstoffverbrauch zusammen. Lediglich die mit Omapatrilat 10^{-7} M behandelten Herzen zeigten eine statistisch signifikant bessere Energieausnutzung (siehe Abb. II.6).

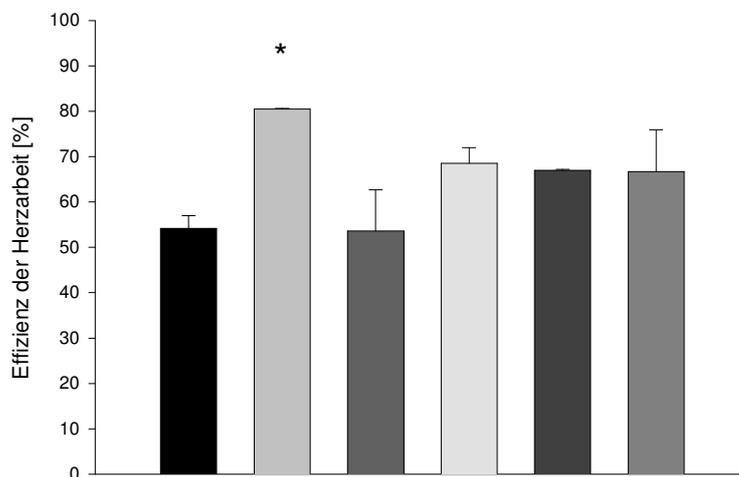


Abb. III.6: Effizienz der Herzarbeit

(* = $p < 0,05$ vs. Kontrollen; $n = 3-7$).

III.1.2.3 Laktatbildung und Laktat/Pyruvat-Quotient

Die Laktatproduktion der Herzen wurde als Parameter zur Beurteilung des anaeroben Stoffwechsels herangezogen. In den ersten Minuten der Reperfusion kam es sowohl bei der Kontroll-, als auch bei der mit Omapatrilat (10^{-7} M) behandelten Gruppe zu einem signifikanten, massiven Laktatanstieg im koronarvenösen Effluat (6570-7370 $\mu\text{mol}/\text{min}$). Dieser „Laktat-Auswasch“ spiegelt die anaerobe Stoffwechsellage während der vorausgegangenen Ischämie wieder. Die Laktatfreisetzung fiel zum Ende der 15-minütigen flusskonstanten

Reperfusionphase in beiden Gruppen auf Ausgangsniveau ab (500-700 $\mu\text{mol}/\text{min}$) und blieb bis zur späten Messung am Ende der zweiten Arbeitsphase etwa gleich. Die Laktatproduktion in den mit Omapatrilat (10^{-7} M) behandelten Herzen unterschied sich jedoch von der der Kontrollherzen in keiner Perfusionsphase.

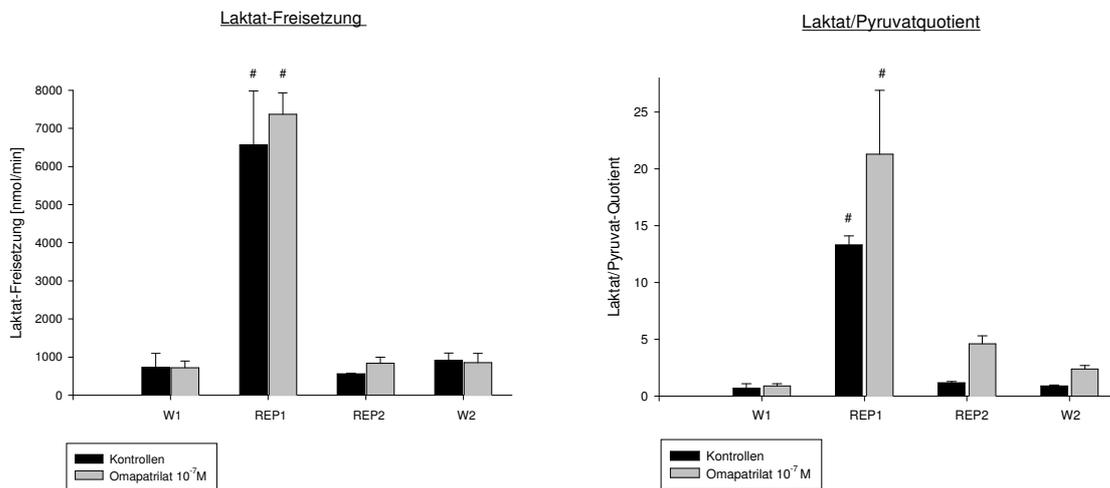


Abb. III.7: Laktatfreisetzung bzw. [Laktat/Pyruvat]-Quotient in arbeitenden Meerschweinchenherzen; (# = $p < 0,05$ vs. präischämisch; $n = 6-7$).

Der Laktat/Pyruvat-Quotient verdeutlicht das Verhältnis von anaerobem (Laktatproduktion) und aerobem Stoffwechsel (Pyruvatverbrauch). Eine Erhöhung des Laktat/Pyruvat-Quotienten zugunsten des Laktats stellt demnach einen empfindlichen Parameter zum Nachweis einer Verschiebung der kardialen Stoffwechselsituation dar und signalisiert einen Sauerstoffmangel. In der Omapatrilat-Gruppe sowie in der Kontrollgruppe erfährt der Laktat/Pyruvat-Quotient in der frühen Reperfusion einen signifikanten Anstieg im Vergleich zum Ausgangswert. Der Unterschied zwischen der Omapatrilat-Gruppe und den Kontrollen ist nicht signifikant.

III.1.2.4 cGMP im koronarvenösen Effluat

Isoliert perfundierte, arbeitende Meerschweinchenherzen setzen nachweisbare Mengen des second messengers cGMP in das koronare Perfusat frei (ca. 600-1000 fmol/min). Die mit exogenem ANP (10^{-9} M) behandelte Gruppe zeigte gegen

Ende der ersten Arbeitsphase die mit Abstand höchsten cGMP-Werte (über 4000 fmol/min), (signifikant gegen alle anderen Gruppen). Die mit Omapatrilat 10^{-7} M bzw. Captopril 10^{-7} M behandelten Gruppen (Gruppen 2, 5 und 7) setzten dagegen relativ geringe Mengen an cGMP frei (276-417 fmol/min). In der postischämischen Arbeitsphase W2 kam es zu sehr unterschiedlichen Veränderungen. Die cGMP-Spiegel sanken auffallend stark in der ANP-Gruppe und in der Captopril-Gruppe. Bei Kontrollherzen und in der 10^{-8} M Omapatrilat-Gruppe kam es zu geringfügigen Verminderungen. Die Omapatrilat 10^{-7} M-Gruppen (Gruppe 2 und 5) weisen keine postischämische cGMP-Veränderungen auf.

	cGMP-Freisetzung in koronarvenöses Effluat [fmol/min]					
	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 5	Gruppe 6	Gruppe 7
	Kontrollen	Omapatrilat 10^{-7} M	Omapatrilat 10^{-8} M	Omapatrilat 10^{-7} M + HOE	ANP 10^{-9} M	Captopril 10^{-7} M
W1	792	276	615	216	4291 #	417
±SEM	±175 n=11	±24 n=6	±122 n=5	±26 n=6	±353 n=5	±76 n=6
W2	688	313	553	216	540	65
±SEM	±210 n=7	±73 n=6	±305 n=5	±24 n=6	±206 n=5	±17 n=6

Tabelle III.9: cGMP-Freisetzung in koronarvenöses Effluat

(# = $p < 0,05$ vs. alle anderen Gruppen).

III.2 Omapatrilat – Wirkung auf die postischämische Freisetzung von ANP, N-terminalem pro-ANP-Fragment [1-30] und TNF- α

Um weiter zu klären, auf welchem Wege Omapatrilat zu einer Verbesserung der prozentualen Erholung der äußeren Herzfunktion führt bzw. durch welches Substrat der neutralen Endopeptidase dies erreicht wird, sollten in weiteren Versuchen ANP, das N-terminale pro-ANP-Fragment [1-30], sowie TNF- α in Effluat bzw. Transsudat bestimmt werden. Dem Umstand entsprechend, dass es keine kommerziellen Antikörper für die Meerschweinchen-Peptide gibt, wurde das Versuchsprotokoll diesmal mit Rattenherzen (im Langendorff-Modus) durchgeführt, die nach einer 15-minütigen, globalen Ischämie über 120 Minuten reperfundiert wurden.

III.2.1 Funktionelle Parameter

III.2.1.1 Koronarvenöser Fluss

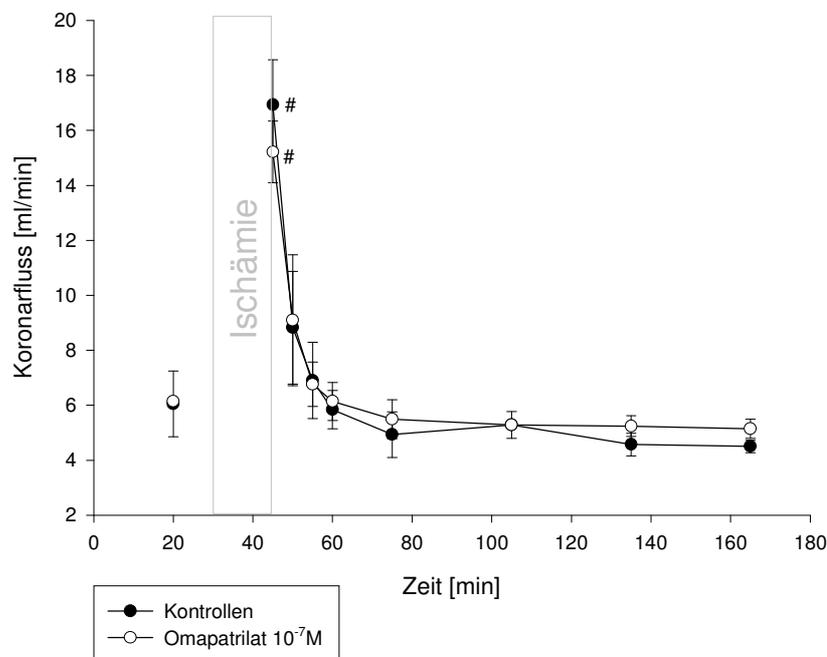


Abb. III.8: Koronarvenöser Fluss aus Rattenherzen im Langendorff-Modus
(Kontrollen (n = 4); Omapatrilat 10⁻⁷ M (n = 5); # = p < 0,05 vs. präischämisch).

Der Koronarfluss der Rattenherzen im Langendorff-Modus zeigte nach 15 Minuten globaler Ischämie einen signifikanten Anstieg sowohl in der Kontroll- als auch in der Omapatrilat (10^{-7} M)-Gruppe (Zeichen einer reaktiven Hyperämie). Nach 10 Minuten Reperfusion waren die Effluatmengen auf das präischämische Niveau zurückgegangen, um während weiterer 110 Reperfusionsminuten noch minimal weiter zu sinken. Wie man in der Abbildung III.8 sieht, sind die Koronarflusskurven der beiden Versuchsgruppen in diesem Protokoll nahezu identisch.

III.2.1.2 Transsudatmessungen

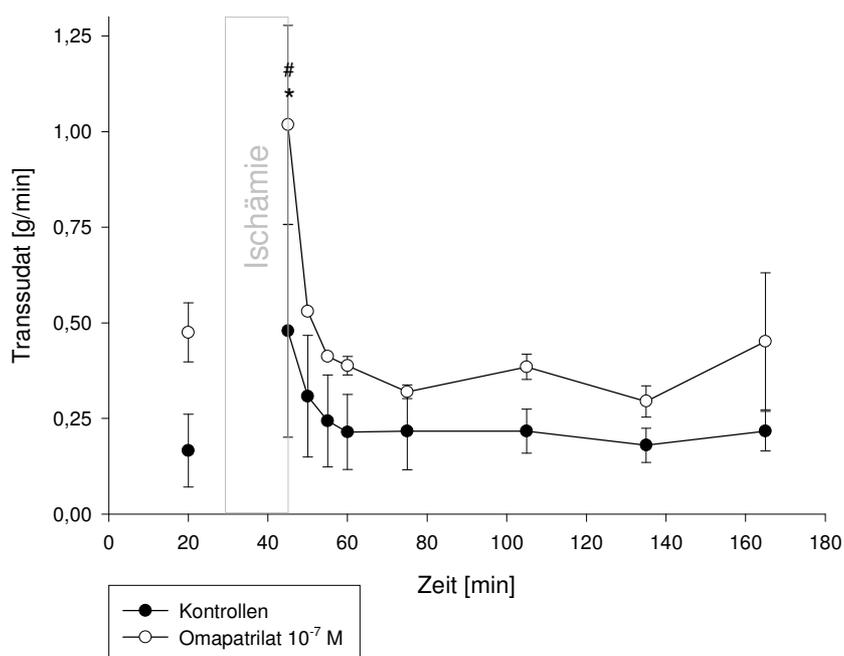


Abb. III.9: Transsudatmessungen prä- und postischämisch

(Kontrollen (n = 4); Omapatrilat 10^{-7} M (n = 5); * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle; # = $p < 0,05$ vs. präischämisch).

Die Transsudatmenge in Omapatrilat-behandelten Herzen war bereits präischämisch leicht erhöht (0,475 vs. 0,166 g/min). In der frühen Reperfusion (2. Minute) gab es einen signifikanten Transsudatanstieg sowohl gegenüber der zeitgleichen Kontrollgruppe, als auch zum Ausgangswert der Omapatrilat-Gruppe. Auch im

weiteren Verlauf der Reperfusion lag die Transsudatbildung der Omapatrilat-Gruppe tendenziell über der der Kontrollherzen, der Unterschied erreichte jedoch kein Signifikanzniveau mehr.

III.2.2 Freisetzung von ANP [1-28]

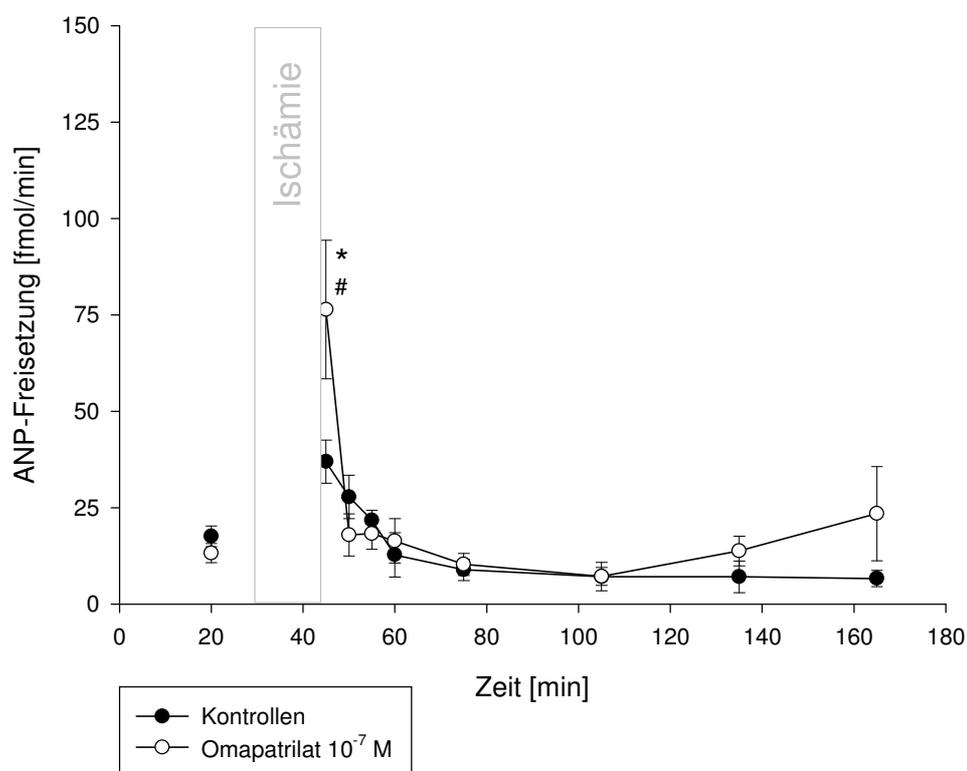


Abb. III.10: ANP [1-28]-Freisetzung aus Rattenherzen (koronarvenöses Effluat)

(Kontrollen (n = 4); Omapatrilat 10⁻⁷ M (n = 5); * = p < 0,05 vs. Kontrolle; # = p < 0,05 vs. präischämisch).

Eine Freisetzung von ANP [1-28] im koronarvenösen Effluat der Rattenherzen war bereits unter präischämischen Bedingungen nachweisbar. Nach 15 Minuten globaler Ischämie kam es zu einem Anstieg der ANP-Abgabe, die in der Omapatrilat-Gruppe einen, gegenüber der Kontrollgruppe, signifikant höheren Wert verzeichnete. Interessanterweise bereits zum zweiten Zeitpunkt der Probenentnahme nach Ischämie (50. Minute des Perfusionsprotokolls bzw. nach 5 Minuten Reperfusion)

waren die Werte fast auf Ausgangsniveau zurückgesunken. Zudem war in der späteren Reperfusion wiederum kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen vorhanden.

III.2.3 Freisetzung von pro-ANP [1-30]

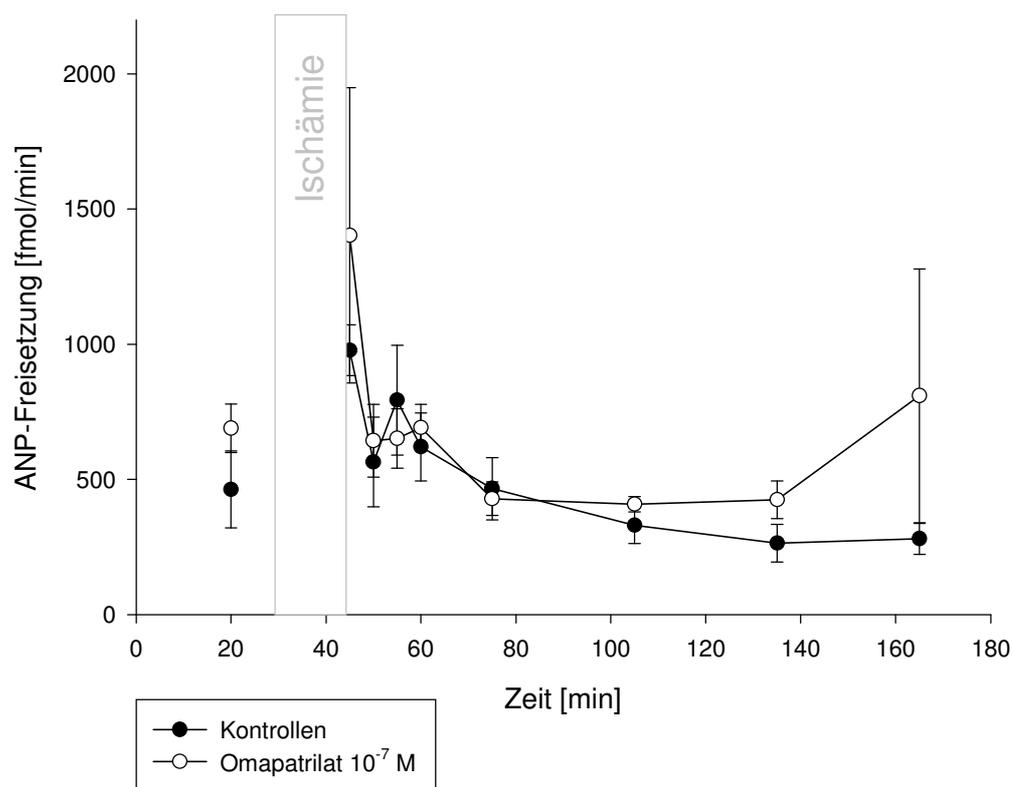


Abb. III.11: Pro-ANP [1-30]-Freisetzung aus Rattenherzen im Langendorff-Modus
(Kontrollen (n = 4); Omapatrilat 10⁻⁷ M (n = 5)).

Die Dynamik der pro-ANP [1-30]-Freisetzung ist im Wesentlichen mit der von ANP [1-28] vergleichbar. Auch im Falle von pro-ANP [1-30] kam es zu einem postischämischen Anstieg in den ersten Reperfusionsmomenten. Allerdings war kein signifikanter Unterschied zwischen der mit Omapatrilat behandelten Gruppe und den Kontrollherzen zu beobachten. In der späteren Reperfusion waren die Freisetzungswerte beider Gruppen wieder auf dem präischämischen Niveau. Beachtenswert sind die Mengendimensionen, die im Falle von pro-ANP [1-30] um

den Faktor 10 höher liegen als bei ANP [1-28] (500-1500 fmol/min vs. 10-100 fmol/min). Diese Werte entsprechen Konzentrationen von jeweils ca. 10^{-9} bzw. 10^{-10} M.

III.2.4 Freisetzung von TNF- α

In *in vitro* Studien mit rekombinatem humanem TACE (TNF- α -cleaving-enzyme) konnte festgestellt werden, dass dieses Enzym durch Omapatrilat gehemmt wird (IC_{50} ca. 5×10^{-6} M; siehe Tabelle III.10).

	TNF- -Peptid	Bildung von Ac-SPLAQA	Hemmung von TACE
ohne Omapatrilat (n = 3)	$2,6 \pm 0,2 \mu\text{M}$	$5,8 \pm 0,3 \mu\text{M}$	0%
Omapatrilat $1 \mu\text{M}$ (n = 3)	$4,4 \pm 0,8 \mu\text{M}$	$5,8 \pm 1,5 \mu\text{M}$	$26,6 \pm 7,9\%$
Omapatrilat $3 \mu\text{M}$ (n = 2)	$5,3 \pm 1,7 \mu\text{M}$	$3,4 \pm 1,4 \mu\text{M}$	$44,3 \pm 1,4\%$
Omapatrilat $10 \mu\text{M}$ (n = 4)	$7,9 \pm 1,0 \mu\text{M}$	$2,1 \pm 0,7 \mu\text{M}$	$74,8 \pm 4,9\%$

Tabelle III.10: Hemmung von TACE durch Omapatrilat

Konzentrationen des TNF- -Peptids Ac-SPLAQAVRSSSR-NH₂ und Ac-SPLAQA, dem spezifischen Spaltprodukt von TNF- bei 37°C für 1 h mit rekombinatem humanen TACE.

Die Rolle von TNF- α bezüglich des Ischämie/Reperfusionsschadens wird derzeit äußerst kontrovers diskutiert. Ob nun eine Abspaltung und damit Freisetzung des Zytokins durch die Zink-Metalloprotease TACE eventuell durch 10^{-7} M Omapatrilat auch im intakten Herzen gehemmt wird, war die Frage bei der Bestimmung der TNF- α -Freisetzung in Rattenherzen.

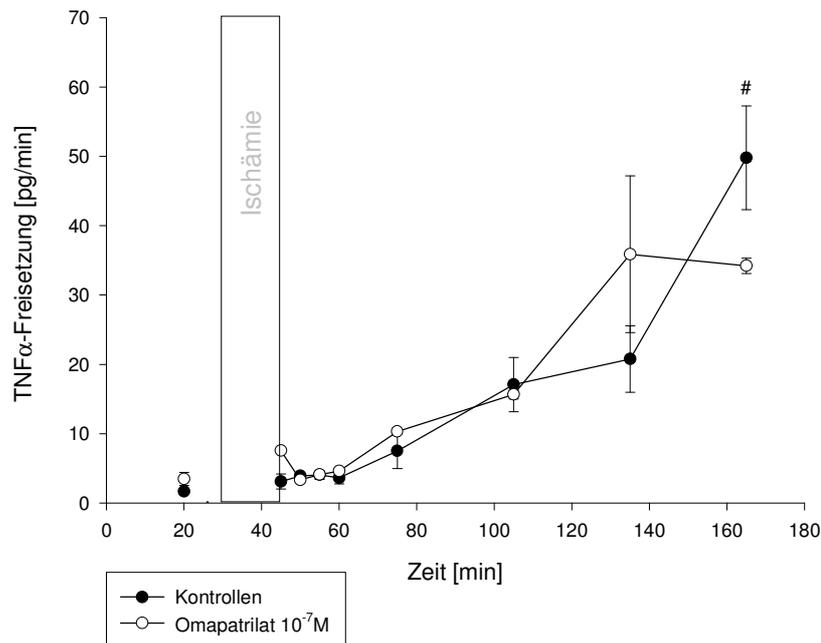


Abb. III.12: TNF- α -Freisetzung aus Rattenherzen im Langendorff-Modus

(Kontrollen (n = 4); Omapatrilat 10^{-7} M (n = 5); # = p < 0,05 vs. präischämisch).

Nach einer 15-minütigen globalen Ischämie setzten sowohl Kontrollherzen als auch die mit Omapatrilat (10^{-7} M) behandelten Rattenherzen zunehmende Mengen von TNF- α in der Reperfusion frei. In der 165. Minute des Protokolls (entspricht einer Reperfusionszeit von 120 Minuten) war der Anstieg signifikant zum Ausgangswert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ergaben sich zu keinem Zeitpunkt (Abb. III.12).

III.3. Wirkung von exogenem pro-ANP [1-30] auf Meerschweinchenherzen im Langendorff-Modus

Um die Auswirkung von exogenem pro-ANP [1-30], alleine und mit Omapatrilat (10^{-7} M) zusammen appliziert, auf das Koronarsystem im Sinne einer Koronardilatation bzw. eine Steigerung der Gefäßpermeabilität zu beurteilen, wurde pro-ANP [1-30] in steigender Konzentration mit und ohne Omapatrilat in Meerschweinchenherzen infundiert. Die Konzentration an pro-ANP [1-30] wurde nach jeweils 5 Minuten stufenweise gesteigert.

III.3.1 Koronarvenöser Fluss

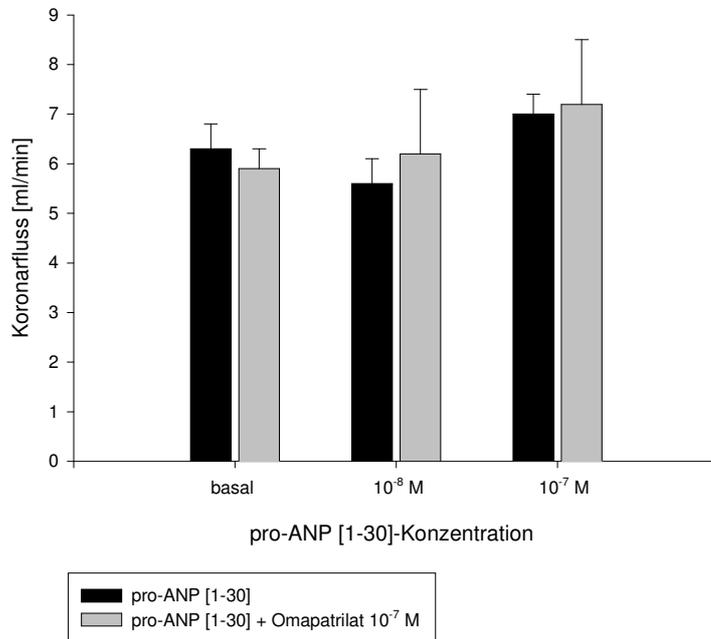


Abb. III.13: Koronarvenöser Fluss während stufenweise gesteigerter pro-ANP [1-30]-Infusion mit und ohne paralleler Omapatrilat (10⁻⁷ M) –Applikation; (n= 3).

Pro-ANP hatte keinen erkennbaren Einfluss auf die koronare Perfusion. Es ergaben sich sowohl bezüglich der verschiedenen Zeitpunkte, als auch bezüglich der jeweiligen Behandlungen keine signifikanten Unterschiede im Koronarfluss.

III.3.2 Transsudatmessungen

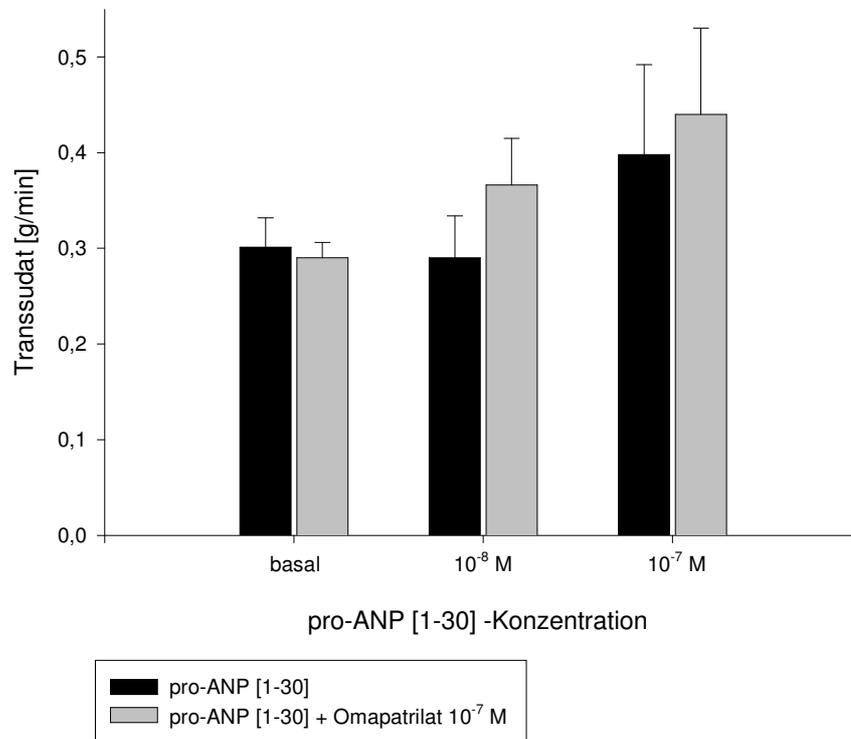


Abb. III.14: Transsudatmessungen während stufenweise gesteigerter pro-ANP [1-30]-Infusion mit und ohne paralleler Omapatrilat (10⁻⁷ M) –Applikation; (n= 3).

Bei Infusion von 10⁻⁸ M und 10⁻⁷ M pro-ANP [1-30] erwiesen sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Transsudatmengen. Lediglich eine Tendenz zu einem gesteigerten Transsudatfluss war bei einer pro-ANP-Infusion in einer Konzentration von 10⁻⁷ M zu sehen. Die zusätzliche Anwesenheit von Omapatrilat 10⁻⁷ M hatte keinen signifikanten Einfluss auf die koronare Leckbildung unter diesen Bedingungen.

IV. Diskussion

IV.1 Diskussion der Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Studie war es, die Frage nach einer kardioprotektiven Wirkung des Vasopeptidase-Inhibitors Omapatrilat nach globaler Ischämie und Reperfusion zu klären und im Falle einer verbesserten postischämischen Herzfunktion die dafür verantwortlichen Mechanismen aufzuzeigen. Da die Vasopeptidase-Inhibitoren eine neue, sich gerade im Zulassungsverfahren befindende Medikamentenklasse zur Behandlung des arteriellen Hypertonus und der Herzinsuffizienz darstellen, gibt es erst wenige Studien, die sich mit möglichen kurz- und längerfristigen protektiven Auswirkungen auf Ischämie- bzw. Reperfusion-geschädigtes Myokardgewebe beschäftigen (Raut, Rouleau, et al. 1999; Blais, Lapointe, et al. 2001; Lapointe, Blais, et al. 2002). Ein Einsatz von Omapatrilat im postmyokardialen Management bzw. in der Akutphase eines Ischämie-Reperfusionsschadens erscheint sinnvoll, da in diesem Zusammenhang Erfolge mit selektiver ACE-Hemmung erzielt worden sind (Gurevitch, Pevni, et al. 1997; Lazar, Bao, et al. 2002; Podesser, Schirnhofner, et al. 2002; Pfeffer, Braunwald, et al. 1992). Auf der anderen Seite werden Mutmaßungen über eine mögliche protektive Wirkung der natriuretischen Peptide, deren Abbau durch eine Hemmung der neutralen Endopeptidase verhindert wird, auf Reperfusion-geschädigtes Myokard angestellt (Takata, Hirayama, et al. 1996; Rastegar, Vegh, et al. 2000; Takagi, Kiuchi, et al. 2000). Zudem wird Bradykinin teilweise von der neutralen Endopeptidase abgebaut. So wäre eine additiv protektive Wirkung des Vasopeptidase-Inhibitors Omapatrilat nach Ischämie und Reperfusion ein denkbarer Effekt. Eine weitere Schutzwirkung könnte letztendlich darin bestehen, dass sich im Omapatrilat-Molekül eine freie Sulfhydryl-Gruppe befindet, die im Rahmen der Reoxygenierung als Antioxidanz fungieren kann.

IV.1.1 Omapatrilat wirkt kardioprotektiv

Den bedeutendsten Parameter zur Beurteilung des Reperfusionsschadens stellt die Erholung der äußeren Herzarbeit dar. Die Kontrollherzen erreichten hier nur 52 %, die Omapatrilat 10^{-7} M Gruppe übertraf diese signifikant mit 78 % Erholung. Trotz relativ inhomogener und unterschiedlicher Ausgangsgruppen, ist die Erholung der äußeren Herzarbeit ein geeigneter Beurteilungsparameter, da sich - auch im absoluten Zahlenwert - geringere EHW-Ausgangswerte nicht in der prozentualen Erholung niederschlagen (siehe Korrelationsgraphen, Abb. IV.1). Die Behandlung der Herzen mit 10^{-7} M Omapatrilat bewirkte eine allgemeine Anhebung des Erholungsniveaus; es bestand nach wie vor keine Beziehung zwischen absolutem Ausgangswert der äußeren Herzarbeit und prozentualer Erholung.

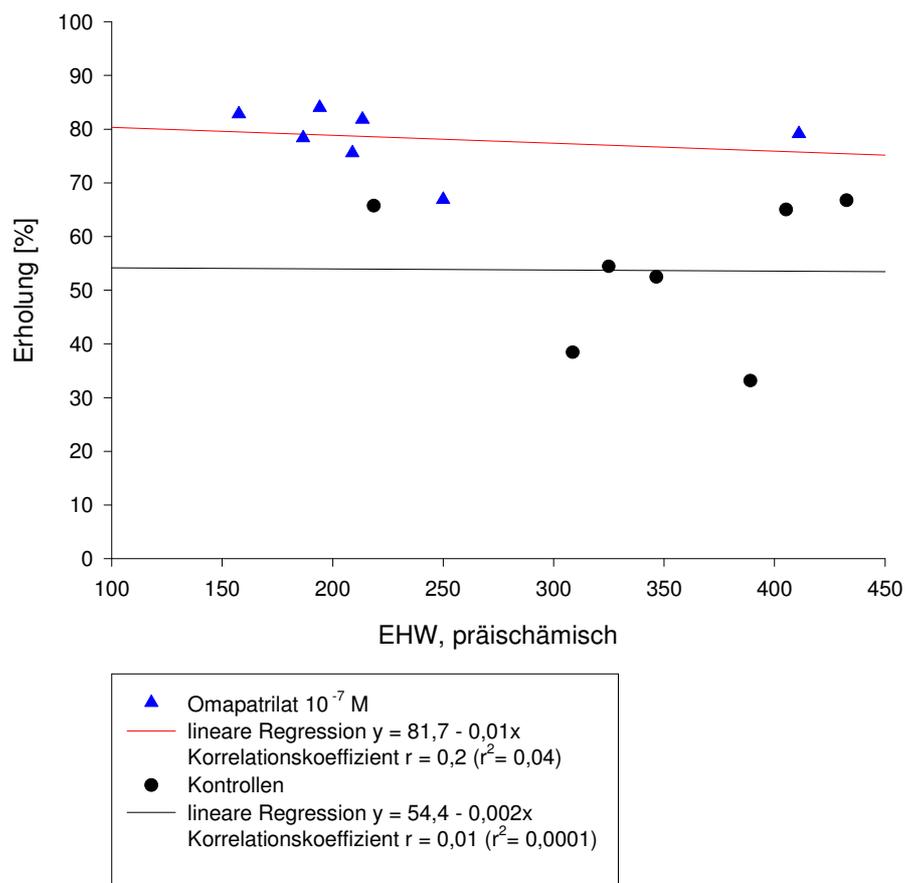


Abb. IV.1: Korrelation zwischen präischämischen EHW-Werten und EHW-Erholung in Kontrollherzen und Herzen mit 10^{-7} M Omapatrilat; (n = 7).

Die positive Wirkung von Omapatrilat auf die Fähigkeit der Herzen postischämisch Herz-Minuten-Volumen zu fördern und damit Druck-Volumen-Arbeit zu verrichten, beruhte nicht auf einer veränderten Herzfrequenz. Diese wurde durch das Ischämie/Reperfusion-Protokoll in keinem Fall signifikant vermindert.

Die möglichen Mechanismen, die zu einer verbesserten Funktion der mit Omapatrilat (10^{-7} M) behandelten Herzen beigetragen haben könnten, werden im Folgenden diskutiert.

IV.1.1.1 Konzentrationsabhängigkeit

Omapatrilat wird eine optimale Dosis-Wirkungsbeziehung im nanomolaren Bereich zugesprochen bei Hemmkonstanten für ACE von 6,0 nmol/l und für NEP von 8,9 nmol/l (Robl, Sun, et al. 1997; Trippodo, Robl, et al. 1998; Burnett 1999). Eine Applikation von Omapatrilat in einer Konzentration von 100 nM (10^{-7} M) führte in unserem Modell zu einer Protektion des durch Ischämie und Reperfusion geschädigten Myokards. Eine niedrigere Dosierung von 10 nM (10^{-8} M) zeigte keinerlei erkennbare Effekte. Folglich muss die duale Hemmung von ACE und NEP nahezu vollständig sein, damit ein protektiver Effekt erzielt wird.

IV.1.1.2 Abhängigkeit vom Applikationszeitpunkt

Bei der medikamentösen Modulation des Ischämie-Reperfusionsschadens spielt der Zeitpunkt des Therapiebeginns eine entscheidende Rolle (Cargnoni, Boraso, et al. 1994; Wang, Pernow, et al. 2002; Massoudy, Becker, et al. 1994; Lazar, Bao, et al. 2002). Je nach Wirkmechanismus des Therapeutikums existieren gewisse Zeitfenster, in denen eine Verabreichung erfolgen muss, um eine Verbesserung der postischämischen Herzfunktion zu erreichen. Auch in dem hier verwendeten Ischämie-Reperfusionmodell war die protektive Wirkung des Vasopeptidase-Inhibitors abhängig vom Applikationszeitpunkt. So musste Omapatrilat bereits vor Einsetzen der Ischämie zugeführt werden. Eine lediglich postischämische Gabe konnte die Schädigung nicht verringern.

Ein möglicher Grund für diesen begrenzten Zeitrahmen ergibt sich bei der Betrachtung des zwar kurzen, aber deutlichen postischämischen ANP-Anstiegs in

den mit Omapatrilat 10^{-7} M behandelten Herzen (siehe auch Kap. IV.1.4.1). In dieser Gruppe sammelt sich das atriale natriuretische Peptid, mutmaßlich wegen verminderten Abbaus durch die gehemmte neutrale Endopeptidase, während der Ischämie zu signifikant höheren Spiegeln an, und kann bei Wiedereinsetzen der Perfusion in der frühen Reperfusionphase eine kardioprotektive Wirkung entfalten. Dies schlägt sich wiederum in einer höheren prozentualen Erholung der äußeren Herzarbeit in der zweiten Arbeitsphase nieder.

Auch im Falle der selektiven ACE-Hemmung wird über definierte Zeitfenster der Applikation berichtet, während der eine Verbesserung der postischämischen Situation erreicht werden kann. Die vorhandenen Erkenntnisse über den besten Zeitpunkt divergieren jedoch beträchtlich (Schoemaker, Debets, et al. 1991; Arad, Shotan, et al. 1992) und sind mutmaßlich stark vom jeweiligen ACE-Hemmer sowie vom Studienprotokoll abhängig (Linz, Wiemer, et al. 1995). So erwies sich zum Teil eine Verabreichung bereits präischämisch oder als Zusatz zur Kardioplegielösung mit Einsetzen der Ischämie als protektiv (Lazar, Volpe, et al. 1998; Cargnoni, Boraso, et al. 1994; Gurevitch, Pevni, et al. 1997). Andererseits ergaben Versuche mit Ramiprilat an einem ähnlichen wie dem hier verwendeten Modell des isoliert arbeitenden Meerschweinchenherzens, dass eine Verabreichung mit Beginn der Reperfusion ausreichte, um eine deutliche Erholung der äußeren Herzarbeit zu erzielen. Eine spätere Infusion, erst zu Beginn der zweiten Arbeitsphase konnte die Schädigung jedoch nicht mehr aufhalten (Massoudy, Becker, et al. 1994). Diese Beobachtung zeigt, dass auch im Falle der ACE-Hemmung gerade die Reperfusionphase einen kritischen Zeitpunkt darstellt, in der die Schutzmechanismen aktiviert sein müssen, um eine Verbesserung in der folgenden Arbeitsphase zu bewirken.

Da Omapatrilat als dualer Vasopeptidase-Inhibitor auch das ACE hemmt, erscheint die Diskrepanz zu Ramiprilat verwunderlich; denn um beiden Komponenten Rechnung zu tragen, war eine präischämische Verabreichung von Omapatrilat in diesem Modell unabdingbar. Möglicherweise ist der Wirkeintritt von Omapatrilat bezüglich der ACE-Hemmung langsamer als der von Ramiprilat, das zudem in höherer Konzentration eingesetzt wurde (10^{-6} M), um eine Kardioprotektion zu demonstrieren (Massoudy, Becker, et al. 1994).

IV.1.2 Captopril – ACE-Hemmer mit Sulfhydryl-Gruppe

Neben den hämodynamischen Eigenschaften haben sich die ACE-Hemmer auch bei der Begrenzung des kardialen Ischämie-/Reperfusionsschadens als effektiv erwiesen (Linz, Wiemer, et al. 1992; Cargnoni, Boraso, et al. 1994; Ertl, Kloner, et al. 1982). Diese protektiven Effekte der ACE-Hemmer auf isoliert perfundierte postischämische Herzen werden weniger auf verminderte Angiotensin II-Spiegel zurückgeführt, als auf erhöhte Bradykininspiegel, die sekundär mit einer gesteigerten lokalen NO-Synthese einhergehen (Zahler, Kupatt, et al. 1999; Massoudy, Becker, et al. 1994; Linz, Wiemer, et al. 1995; Zhang, Scicli, et al. 1997; Wiemer, Schölkens, et al. 1991). Unterstützt wird diese These durch Studien, die mit exogen infundiertem Bradykinin ähnliche Effekte erreichten, wohingegen durch eine alleinige Blockade von AT₁-Rezeptoren keine Verbesserung erzielt werden konnte (Massoudy, Becker, et al. 1994).

Die Hemmung von ACE in isolierten Meerschweinchenherzen mittels Captopril hat sich in vorliegender Versuchsreihe als nicht kardioprotektiv erwiesen, was mehreren anderen Studien entgegensteht. So wurde in verschiedenen Versuchsreihen an isolierten Rattenherzen eine Verbesserung der Herzfunktion nach Ischämie durch Captopril aufgezeigt (Takeda, Takashi, et al. 1997; Pi & Chen 1989; Linz, Wiemer, et al. 1992). Captopril wurde in dem hier verwendeten Protokoll in relativ geringer Konzentration (10^{-7} M) eingesetzt. Zudem haben Meerschweinchen eine viel höhere ACE-Aktivität als Ratten (Yang, Erdös, et al. 1971). Darüber hinaus gehört Captopril zu den ACE-Hemmern der ersten Generation, die eine sehr geringe Gewebeaffinität aufweisen (Dzau, Bernstein, et al. 2002; Lazar, Bao, et al. 2001).

Die Unwirksamkeit von Captopril in unserem Modell hilft aber bei der Klärung des Wirkmechanismus von Omapatrilat. Captopril enthält nämlich, wie Omapatrilat, eine Sulfhydryl-Gruppe im Molekül. Durch Verabreichung von Captopril in gleich hoher Konzentration sollte eine eventuelle Kardioprotektion, wie sie durch eine Sulfhydryl-Gruppe vermittelt werden kann, zu Tage treten. Verbindungen mit Sulfhydrylgruppen können im Rahmen eines Ischämie-Reperfusionsschadens durch eine Scavenger-Wirkung auf Sauerstoffradikale und andere toxische Metabolite kardioprotektiv

agieren (Lesnefsky, Dauber, et al. 1991; Becker, Reinholz, et al. 1991; Goldschmidt & Tallrida 1991). Da die mit Captopril behandelten Herzen keine wesentlich verbesserte postischämische Herzfunktion zeigten, lässt sich folgern, dass die SH-Gruppe im Omapatrilat-Molekül den Reperfusionsschaden durch ihre antioxidativen Eigenschaften nicht nachhaltig beeinflusst hat.

IV.1.3 Kardioprotektion durch Omapatrilat - ein Bradykinin-vermittelter Effekt?

Durch eine kombinierte Hemmung der beiden Metallopeptidasen ACE und NEP beeinflussen die Vasopeptidase-Inhibitoren ebenfalls den Bradykinin-Metabolismus im Herzen (Dumoulin, Adam, et al. 1998; Burnett 1999; Corti, Burnett, et al. 2001). Somit können durch eine Behandlung mit Omapatrilat additiv hohe Bradykininwerte erzielt werden (Dumoulin, Adam, et al. 2001; Sagnella 2001; Raut, Rouleau, et al. 1999; Boix 2002).

Bradykinin übt seine zellulären Wirkungen über Bindung an BK₂-Membran-Rezeptoren aus. Die Synthetisierung eines selektiven Rezeptor-Antagonisten Icatibant (HOE 140) für diese BK₂-Rezeptoren erleichterte Untersuchungen von Bradykinin-abhängigen Wirkungsweisen, gerade im Zusammenhang mit einer ACE-Hemmung. So zeigte eine simultane Applikation von ACE-Hemmern und BK₂-Rezeptor-Antagonist Icatibant in mehreren Studien einen deutlichen Abfall der kardioprotektiven Wirkung der ACE-Inhibitoren (Massoudy, Becker, et al. 1994; Hartman 1995; Linz, Wiemer, et al. 1992). Auch in den vorliegenden Versuchsreihen verursachte HOE 140 (10^{-8} M) eine eingeschränkte Erholung der mit Omapatrilat 10^{-7} M behandelten Herzen. Jedoch war dieser Abfall unerwartet gering; die prozentuale postischämische Erholung erreichte nahezu Signifikanzniveau, was zur Vermutung führt, dass Bradykinin zwar an einer Protektion beteiligt ist, jedoch nicht allein für die mit Omapatrilat erreichte verbesserte Herzfunktion verantwortlich sein kann.

IV.1.4 Hemmung der neutralen Endopeptidase – die natriuretischen Peptide und weitere mögliche Substrate

Als zusätzliche Mediatoren der Kardioprotektion durch Omapatrilat kommen neben Bradykinin eine Reihe der weiteren, vielzähligen Substrate der neutralen Endopeptidase in Frage, allen voran die natriuretischen Peptide. Diese rücken vor allem aufgrund ihrer hypotensiven, natriuretischen Wirkung immer mehr in den Vordergrund des klinisch therapeutischen Interesses. Wegen ihrer kurzen Halbwertszeit und aufwendigen Applikationsart (parenteral) und nicht zuletzt aus Kostengründen ist eine NEP-Hemmung und ein damit verbundener sekundärer Anstieg der endogenen natriuretischen Peptide prinzipiell einer exogenen Verabreichung vorzuziehen (Sagnella 2001). Um die Wirkung der einzelnen natriuretischen Peptide selektiv zu eruieren, ist eine exogene Applikation jedoch aufschlussreich.

IV.1.4.1 Exogenes und endogenes ANP

Derzeit gibt es nur einige wenige Studien, die sich mit der Wirkung von exogen applizierten ANP auf ischämisches Myokardgewebe beschäftigen (Okawa, Horimoto 2002; Takata, Hirayama, et al. 1996; Takagi, Kiuchi, et al. 2000; Rastegar, Vegh, et al. 2000; Hayashi, Tsutamoto, et al. 2001). Diesem zufolge scheint ANP sowohl in der Akutphase als auch im Langzeitverlauf eine protektive Wirkung zu vermitteln. Über die Mechanismen werden unterschiedlichste Mutmaßungen angestellt. Takata et al. beschreibt in einem Hunde-Modell mit induziertem Koronararterienverschluss und anschließender Reperfusion eine verminderte Anzahl an ventrikulären Arrhythmien und einen höheren postischämischen ATP-Gehalt des Myokards, wenn ANP mit Beginn des Gefäßverschlusses infundiert wurde. Rastegar findet in einer vergleichbaren Versuchsanordnung ebenfalls signifikant weniger ventrikuläre Arrhythmien nach präischämischer ANP-Applikation. Diese Effekte werden spekulativ einem cGMP-vermitteltem Mechanismus zugeordnet (Takata, Hirayama, et al. 1996, Rastegar, Vegh, et al. 2000). In einem ähnlichen Hunde-Modell zeigen Takagi et al. eine signifikante Einschränkung des Infarktareals bei den mit Caperitide, einem ANP-Analogen, behandelten Hundeherzen. Auch hier wird ANP vor Einsetzen der

Reperfusion, während der Ischämie verabreicht. Die Protektion wird über eine verbesserte Sauerstoffversorgung und einen gesteigerten kollateralen Blutfluss erklärt (Takagi, Kiuchi, et al. 2000). Der genaue Mechanismus der zu einer ANP-vermittelten Kardioprotektion führt, ist bisher noch unklar.

In der vorliegenden Studie führte die Infusion von exogenem ANP (10^{-9} M) zu einer tendenziell besseren Erholung der äußeren Herzarbeit. Die Wirkung erreichte jedoch, ähnlich wie in der Omapatrilat + HOE 140-Gruppe weder die Erholung der Omapatrilat (10^{-7} M)-Gruppe noch, statistisch gesehen, Signifikanzniveau.

Omapatrilat führt durch die Hemmung der neutralen Endopeptidase zu einem Anstieg von endogenem ANP (Lapointe, Blais, et al. 2002). Um dies in unserem Modell, in der Akutphase eines myokardialen Ischämie-Reperfusionsschadens zu verifizieren, wurde die Freisetzung von ANP im koronarvenösen Effluat gemessen. Hier konnte ein signifikanter Anstieg direkt nach Ischämie, in den ersten Minuten der Reperfusion, gezeigt werden. Dies spiegelt mutmaßlich einen Auswascheffekt von ANP wieder, das während der Ischämie aus den Speichergranula sezerniert worden ist und durch die gehemmte Aktivität der neutralen Endopeptidase vor einem Abbau geschützt ist. Der angedeutete zweite Anstieg in der späten Reperfusion (60. – 90. Minute) ist wohl als einsetzende Neusynthese des Peptids zu werten. Dieser späte Anstieg ist jedoch als Ursache einer verbesserten Herzfunktion in unserem Modell zeitlich nicht mehr relevant.

So lässt die Betrachtung der ANP-Gruppe zusammen mit den ANP-Messungen schlussfolgern, dass Omapatrilat zu signifikant höheren postischämischen Spiegeln an ANP [1-28] führt, diese jedoch nicht allein für die erreichte Kardioprotektion verantwortlich sein können.

IV.1.4.2 N-terminales pro-ANP-Fragment [1-30]

Das N-terminale pro-ANP-Fragment [1-30], auch 'long acting ANP' genannt, weist zum Teil ähnliche Eigenschaften wie ANP [1-28] auf (Diurese, Natriurese, Vasodilatation) (Chiou & Vesely 1995; Vesely 2001). Neben diesen Gemeinsamkeiten mit reifem ANP werden den N-terminalen ANP-Fragmenten jedoch auch andere Eigenschaften zugesprochen, z. B. eine Hemmung der renalen Na-K-ATPase und der Prostaglandin E₂-Synthese (Gunning, Brady, et al. 1992;

Chiou & Vesely 2001). Außerdem wird über eine Bindung der N-terminalen ANP-Fragmente an spezifische Rezeptoren spekuliert (Vesely, Cornett, et al. 1990; Beltowski 2000).

Die Freisetzungsdynamik von pro-ANP in Rattenherzen dieser Studie gleicht im Wesentlichen der von reifem ANP [1-28]. Jedoch werden mit Omapatrilat 10^{-7} M keine signifikant höheren Spiegel an pro-ANP [1-30] nach Ischämie erzielt. Daraus lässt sich folgern, dass Omapatrilat-hemmbar Peptidasen nicht grundlegend am Abbau des pro-ANP-Fragments beteiligt sind. Über einen verminderten enzymatischen Abbau, verglichen mit reifem ANP, wurde berichtet (Hall, Aaberg, et al. 1995), was den geringen Effekt einer NEP-Hemmung auf die Spiegel des 'long acting natriuretic peptide' erklären würde.

Interessanterweise übersteigen die Spiegel von pro-ANP [1-30] im koronarvenösen Effluat der Rattenherzen die ANP-Werte durchschnittlich um den Faktor 5-10. Diese Unterschiede entsprechen den Berichten aus anderen Studien (Dietz, Nazian, et al. 1991; Onuoha & Alpar 2001). Da beide Peptide vom selben Präkursor-Protein abstammen (Itoh, Nadao, et al. 1988), wird eine längere biologische Halbwertszeit von pro-ANP im Plasma angenommen, die wiederum auf verschiedenen Wegen der Rezeptorbindung und Peptiddegradierung gründen könnten (Onuoha & Alpar 2001; Chiou & Vesely 1995; Dietz, Nazian, et al. 1991; Beltowski 2000).

Pro-ANP wurde zum einen im koronarvenösen Effluat (30-80 fmol/ml), zum anderen im kardialen Transsudat gemessen (570-800 fmol/ml). Das Verhältnis der Konzentrationen an pro-ANP in den beiden Kompartimenten lag somit bei ca. 1:10 (Effluat:Transsudat). Da ANP und pro-ANP initial zu gleichen Teilen bei der Prozessierung von pro-ANP freigesetzt werden (Itoh, Nadao, et al. 1988; Dietz, Nazian, et al. 1991) und lediglich einer unterschiedlichen Abbaukinetik unterworfen sind, lässt sich das Konzentrationsverhältnis von Transsudat zu Effluat auch auf die Spiegel von ANP [1-28] übertragen. Dies würde demzufolge bei Konzentrationen von 1,5-4,9 fmol/ml im Effluat einer Konzentration von etwa 15-50 fmol/ml im Transsudat entsprechen. Diese Konzentration liegt ca. eine Größenordnung unter der, in der exogenes ANP eine gewisse kardioprotektive Wirkung zu entfalten vermochte (10^{-10} M gegen 10^{-9} M).

Entgegen seiner beschriebenen vasodilatatorischen Wirkung (Martin, Pevahouse, et al. 1990), zeigte pro-ANP [1-30] bei einer stufenweise bis 3×10^{-6} M gesteigerten Infusion in isolierte Meerschweinchenherzen keine Steigerung des Koronarflusses. Bezüglich der Permeabilität ist, mit Omapatrilat 10^{-7} M gleichzeitig verabreicht, eine Tendenz zu einer gesteigerten Leckinduktion durch pro-ANP [1-30] zu sehen. Das N-terminale pro-ANP-Fragment [1-30] hat unseren Studien zufolge keinen nachhaltigen Einfluss auf die Herzen und dürfte daher für die Verbesserung der postischämischen Herzfunktion durch Omapatrilat in diesem Modell nicht hauptverantwortlich sein. Hierfür spricht zudem die unveränderte kardiale Abgabe an pro-ANP in Gegenwart von Omapatrilat.

IV.1.4.3 Brain natriuretic peptide (BNP)

Über eine protektive Wirkung von BNP auf ischämisches Myokard gibt es bislang wenige Informationen (D'Souza, Yellon, et al. 2003). Die Wirkungen von BNP scheinen im Wesentlichen denen von ANP ähnlich zu sein (Levin, Gardner, et al. 1998; Stein & Levin 1998). Für BNP konnte im Gegensatz zu ANP und CNP noch kein eigener spezifischer Rezeptor identifiziert werden (Wilkins, Redondo, et al. 1997). Eine weitere Besonderheit, die BNP zuteil wird, ist seine äußerst rasche Sekretion und Genexpression nach adäquatem Stimulus, wie z. B. Ischämie in Form eines Myokardinfarktes (Stein & Levin 1998). Dies wird auf eine strukturelle Besonderheit seiner mRNA, eine AUUUA-Sequenz, die den meisten der Akut-Phase-Proteine zueigen ist, zurückgeführt (Caput, Beutler, et al. 1986; Mukoyama, Nakao, et al. 1991). Der Abbau von BNP dagegen geht langsamer von statten (Naruse, Takeyama, et al. 1994; Mukoyama, Nakao, et al. 1991), was vermutlich durch seine geringere Affinität zur neutralen Endopeptidase bedingt ist (Kenny, Bourne, et al. 1993). Dies würde implizieren, dass eine NEP-Hemmung weniger Einfluss auf die Dynamik der BNP-Spiegel hätte. Eine Beteiligung von BNP an der verbesserten postischämischen Herzfunktion durch Omapatrilat ist daher wenig wahrscheinlich.

IV.1.4.4 C-type natriuretic peptide (CNP)

CNP wird im Gefäßendothel gebildet und u. a. bei schädigenden Einflüssen auf das Endothel freigesetzt (Barr, Rhodes, et al. 1996). Der spezifische Rezeptor für CNP ist der NPR-B (Hirose, Furukawa, et al. 1998). CNP ist insofern von den anderen natriuretischen Peptiden zu differenzieren, als seine Wirkung entgegen seinem Namen nicht natriuretisch ist, sondern betont vasorelaxierend (Clavell, Stingo, et al. 1993). Der Abbau von CNP erfolgt wie bei anderen natriuretischen Peptiden zum einen über die neutrale Endopeptidase, wobei CNP *in vitro* am schnellsten von NEP hydrolysiert wird. Andererseits bindet CNP auch an den NPR-C. Da die Wirkung von CNP mit vergleichsweise geringen Steigerungen einhergehender cGMP-Spiegel beschrieben wird, wird auch über cGMP-unabhängige Mechanismen diskutiert, insbesondere eine vasorelaxierende Wirkungsvermittlung über Kaliumkanäle (Wei, Aarhus, et al. 1993). So kommt auch CNP als möglicher zusätzlicher Mediator für eine Kardioprotektion durch Omapatrilat in Frage.

IV.1.4.5 Endothelin

Endothelin ist ein potenter Vasokonstriktor, der sowohl im Endothel, in glatten Muskelzellen, als auch in Kardiomyozyten produziert wird. Seine Freisetzung erfolgt auf eine Reihe von Stimuli, u. a. nach Ischämie und Reperfusion (Pernow & Wang 1997, Wang, Pernow, et al. 2002). Eine Kardioprotektion durch Senkung der Endothelin-Spiegel ist in diesem Zusammenhang durchaus denkbar, da Endothelin eine nicht zu vernachlässigende negative Rolle beim Reperfusionsschaden spielen kann (Pernow & Wang 1997).

Die neutrale Endopeptidase weist bekannterweise eine breite Substratspezifität auf, wobei sie Peptide vornehmlich am N-terminalen Ende hydrophober Aminosäuren spaltet (Erdös & Skidgel 1989). So gesehen wäre auch die Trp-Val-Bindung im Big-Endothelin-Peptid eine Möglichkeit zur Spaltung und damit zur Freisetzung von Endothelin-1 (Turner & Murphy 1996). Daher wurde über eine mögliche Aktivität der neutralen Endopeptidase als 'Endothelin-Converting-Enzyme' immer wieder spekuliert (Murphy, Corder, et al. 1994). Weit mehr Studien zeigen jedoch, dass die neutrale Endopeptidase weniger an der Freisetzung von Endothelin-1 als am Abbau

des Vasokonstriktors beteiligt ist (Ferro, Spratt, 1998, Vijayaraghavan, Scicli, et al. 1990). Zudem kann Endothelin in kleiner Konzentration eine NO-vermittelte Kardioprotektion hervorrufen (Massoudy, Zahler, et al. 1997). Wie also eine Hemmung der neutralen Endopeptidase die Endothelin-Wirkung bei Ischämie-Reperfusion beeinflusst, kann nur sehr schwer vorhergesagt werden.

IV.1.4.6 TNF- α

Tumor-Nekrose-Faktor- α ist ein Zytokin, das unter anderem durch Ischämie und Reperfusion des Gewebes aktiviert wird (Gurevitch, Frolkis, et al. 1996). Eine verminderte Abspaltung und damit geringere Freisetzung von TNF- α durch eine Omapatrilat-induzierte Hemmung des TACE (TNF- α -cleaving-enzyme) könnte eine protektive Wirkung bei Reperfusion bewirken. Dass Omapatrilat TACE, das wie ACE und NEP eine Zink-abhängige Metalloprotease ist, hemmen könnte, wurde in dieser Arbeit durch *in vitro* - Versuche erstmalig gezeigt (siehe Kap.: III.2.4). Da eine Inhibitor konstante von ca. 10 μ M gefunden wurde, war zu vermuten, dass die zur Kardioprotektion eingesetzte Konzentration von Omapatrilat zu gering sein würde, um die TACE-Aktivität im intakten Organ nennenswert zu hemmen. Bei den Studien am isolierten Rattenherz konnte dieser Verdacht bestätigt werden: Omapatrilat 10⁻⁷M zeigte keinen erkennbaren Effekt auf die TNF- α -Freisetzung im Vergleich zu den Kontrollherzen.

IV.1.5 Zwischenbilanz

Aus unseren Versuchsreihen lässt sich nun schließen, dass weder Bradykinin noch ANP oder pro-ANP alleine für die protektive Wirkung von Omapatrilat verantwortlich ist. Ein additiver Effekt dieser Peptide oder womöglich weiterer Substrate der neutralen Endopeptidase (CNP, Endothelin) in dieser Situation muss daher zum Tragen kommen und die Kardioprotektion herbeiführen. Im weiteren Verlauf der Diskussion sollen die durch Omapatrilat herbeigeführten mikrovaskulären und metabolischen Veränderungen mit diesem Hintergrund analysiert werden.

IV.1.5.1 Ist eine Vasodilatation an der Kardioprotektion beteiligt?

Die genauen Mechanismen der Beteiligung von Bradykinin an der Minderung des Reperfusionsschadens sind noch nicht geklärt. Kininogene werden in der Gefäßwand durch ein lokales Kinin-System synthetisiert und zu Bradykinin gespalten, das seinen vasodilatierenden Effekt über NO und Prostaglandine (Bhoola, Figueroa, et al. 1992; Massoudy, Becker, et al. 1994; Komaru, Kanatsuka, et al. 2000) ausübt. Die Gefäßerweiterung und die damit verbundene Zunahme der Durchblutung und Steigerung des Sauerstoffangebots tragen möglicherweise zu einer Funktionsverbesserung nach Ischämie-/Reperfusion bei (Hartman 1995; Pepine 1998). In Versuchen mit ACE-Inhibitoren am Modell des isoliert perfundierten Meerschweinchenherzens wird eine protektive Wirkung durch Bradykinin weniger aufgrund seiner gefäßerweiternden Wirkung, sondern eher sekundär über NO als Radikalfänger erklärt (Massoudy, Becker, et al. 1995).

Auch ANP ist vasodilatatorisch wirksam, jedoch wird eine Vasodilatation nicht als Hauptursache der postischämischen Protektion angenommen (Rastegar, Vegh, et al. 2000; Takata, Hirayama, et al. 1996; Chu & Cobb 1987).

In vorliegender Studie zeigt die Captopril-Gruppe im Vergleich zu den Kontrollherzen eine signifikant geringere postischämische Koronarflussabnahme, was als indirektes Zeichen einer Koronardilatation zu werten ist. Diese schlägt sich jedoch nicht in einer deutlich besseren Erholung der Herzen in der Captopril-Gruppe nieder. Ebenfalls im Falle der ANP-Gruppe als auch interessanterweise in den mit Omapatrilat und HOE 140 behandelten Herzen fällt die Abnahme des Koronarflusses signifikant geringer aus, ohne mit einer signifikant verbesserten Erholung einherzugehen. Dagegen ist in den Omapatrilat (10^{-7} M) behandelten Herzen, die sich postischämisch deutlich erholen, lediglich eine Tendenz zur Dilatation zu sehen. Daraus lässt sich schließen, dass eine Koronardilatation ein möglicher Begleitmechanismus, jedoch nicht hauptverantwortlich für eine Kardioprotektion mit Omapatrilat ist.

IV.1.5.2 Omapatrilat führt zu einer Steigerung der myokardialen mikrovaskulären Permeabilität - BK und ANP als Mediatoren?

In den mit Omapatrilat behandelten Rattenherzen kam es zu einem signifikanten postischämischen Transsudatanstieg im Vergleich zu den Kontrollen. Eine gesteigerte Endothelpermeabilität kann die Entstehung eines interzellulären Ödems verursachen, das einem suffizienten Gasaustausch entgegensteht und die physiologische Barrierefunktion des Endothels aufhebt (Lum & Malik 1994). Im Falle des Ischämie-Reperfusionsschadens würde ein solches Ödem die Situation weiter verschlimmern. Die interstitielle Flüssigkeitsansammlung wirkt sich auch negativ auf die myokardiale Kontraktilität aus.

Neben einer Vasodilatation wird Bradykinin auch eine starke permeabilitätsteigernde Wirkung auf das Gefäßendothel zugesprochen (Lum & Malik 1994; Regoli & Barabe 1980). Eindrücklich bestätigt wird die Beteiligung von Bradykinin an der Endothelpermeabilität in vorliegender Studie durch Zugabe des BK₂-Rezeptor-Antagonisten Icatibant (HOE 140). Hierbei kommt es zu einer signifikanten Abnahme des Transsudatflusses. Diese Beobachtung geht mit denen aus anderen Studien konform (Emanuelli, Grady, et al. 1998). Der genaue Mechanismus der Leckinduktion ist nicht bekannt; es könnte aber eine NO-vermittelte Steigerung des second messenger cGMP in den Endothelzellen daran beteiligt sein.

Auch ANP ist wesentlich an der Permeabilitätsmodulation beteiligt, wie die hier gezeigten Experimente mit exogen appliziertem ANP belegen. Der ANP-vermittelte Blutdruckabfall *in vivo* wird zum Teil über eine Verlagerung von Flüssigkeit aus dem intravasalen in den Extravasalraum erklärt (Wijeyaratne & Moulton 1993; Levin, Gardner, et al. 1998). Dies bringt eine Zunahme der endothelialen Gefäßpermeabilität zum Ausdruck. Wie nun ANP, das über Bindung an seinen Membranrezeptor zu einer gesteigerten cGMP-Bildung in Endothelzellen führt, gleichzeitig eine Endothel-Leckage verursacht, ist unklar (Meyer & Huxley 1992). Es besteht Uneinigkeit bezüglich der Rolle, die der second messenger cGMP dabei spielt (Hölschermann, Noll, et al. 1997). Es gibt sowohl Studien, die eine Zunahme (Lofton, Mewnam, et al. 1990), als auch Arbeiten, die eine Abnahme der Permeabilität propagieren (Meyer & Huxley 1992; Yonemaru, Ishii, et al. 1992). Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür wäre, dass konstant erhöhte cGMP-Spiegel ein

Endothelleck verhindern, ein plötzlicher, steiler Anstieg jedoch die Permeabilität steigern kann (Yonemaru, Ishii, et al. 1992).

IV.1.5.3 Die Rolle von cGMP

Der second messenger cGMP wird zum einen durch die lösliche Guanylylcyclase, die durch NO stimuliert wird, zum anderen über die membrangebundene Guanylylcyclase, die von den NPR-A und NPR-B aktiviert wird, aus GTP gebildet. Somit können sowohl eine ACE-, als auch eine NEP-Hemmung konsekutiv zu erhöhten cGMP-Spiegeln führen. Dies vermittelt daraufhin als second messenger auf zellulärer Ebene die Effekte der Hemmstoffe weiter. Beispielsweise kommt es über eine Hemmung der Kalzium-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum sowie Hemmung von spannungsabhängigen Kalziumkanälen zu einer cGMP-vermittelten Senkung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Those & Kanno 1993; Takata, Hirayama, et al. 1996).

Durch Ausschleusung von cGMP aus den Zellen kommt es nach Stimulation der Guanylylcyclasen zu einem Anstieg des cGMP-Spiegels im Plasma bzw. im koronaren Effluat. Dem entsprechend sind auch in der mit exogenem ANP behandelten Gruppe unserer Versuchsreihe signifikant hohe cGMP-Spiegel zu sehen, die die protektive Wirkung vermittelt haben könnten. Entgegen den Berichten anderer Studien (Molinaro, Rouleau, et al. 2002), führte Omapatrilat nicht zu einem signifikanten cGMP-Anstieg in unseren Herzen. Dies führt zu dem Schluss, dass in diesem Versuchsmodell hohe cGMP-Spiegel, die als Mediatoren für die ANP-abhängigen Wirkungen angenommen werden (Levin, Gardner, et al. 1998), nicht wesentlich zu einer Verminderung des Reperfusionsschadens durch Omapatrilat beigetragen haben.

Auffällig bei den cGMP-Messungen war, dass die koronare cGMP-Abgabe in allen Herzen, die mit Omapatrilat 10^{-7} M bzw. Captopril 10^{-7} M behandelt wurden, deutlich niedriger war als in den Kontrollherzen und den mit Omapatrilat 10^{-8} M behandelten Herzen. Sowohl Omapatrilat, also auch Captopril enthalten eine freie Sulfhydryl-Gruppe im Molekül und können somit der oxidativen Schädigung von Zellmembranen

entgegenwirken. Dieser hier erstmalig beobachtete Einfluss von Verbindungen mit einer freien SH-Gruppe auf den Austritt von cGMP legt den Verdacht nahe, dass antioxidativer Schutz eine Entkopplung zwischen intra- und extrazellulären Spiegeln von cGMP verursacht. Der Vergleich mit Captopril in gleicher Konzentration beweist jedoch, dass diese weitere Wirkkomponente von Omapatrilat nicht alleine für die Kardioprotektion verantwortlich sein kann.

IV.1.5.4 Myokardialer Sauerstoffhaushalt und Laktat-/Pyruvat-Stoffwechsel

Eine gute Erholung der postischämischen Herzarbeit kann prinzipiell auch über ein verbessertes Verhältnis von Sauerstoffangebot zu Sauerstoffverbrauch zustande kommen. Aus den in dieser Studie gemessenen Parametern des O₂-Metabolismus ist eine solche Wirkung von Omapatrilat nicht eindeutig zu erkennen.

Ein Anstieg der Laktatkonzentration im koronarvenösen Effluat dient als Marker des anaeroben Metabolismus und damit als Hinweis auf eine Gewebehypoxie bzw. – ischämie. Allerdings besteht zwischen Laktatkonzentration und Sauerstoffangebot keine einfache Beziehung. In hypoxischem bzw. ischämischem Gewebe aktiviert der Pyruvatanstieg das Enzym Laktatdehydrogenase (LDH), das die Reaktion von Pyruvat zu Laktat katalysiert. Die Konsequenz aus dieser Stoffwechselverschiebung ist ein Anstieg von intrazellulärer Milchsäure mit Verschiebung des pH in saure Bereiche. Während der folgenden Reperfusion kommt es zur Ausschwemmung mit Anstieg des Laktats im koronarvenösen Effluat. Andererseits kommt es bei Herzen, die vermehrt Pyruvat und Glucose aerob verstoffwechseln zwangsläufig auch zu einer Zunahme der Laktatbildung.

Da bei Sauerstoffmangel weniger Pyruvat vom Herzen mitochondrial verbraucht wird, dient ein Anstieg des Laktat-/Pyruvatquotienten als ein sicherer Hinweis darauf, dass das Sauerstoffangebot nicht den Stoffwechselbedürfnissen entspricht. Die Laktatproduktion, wie auch der Laktat-/Pyruvat-Quotient fielen zu allen Messzeitpunkten zwischen der Kontrollgruppe und der Omapatrilat 10⁻⁷ M-Gruppe nicht signifikant verschieden aus. Dies weist, bei hohen Laktatwerten in der frühen Reperfusion, darauf hin, dass die anaerobe Stoffwechsellage während der Ischämie in beiden Gruppen ähnlich zu beurteilen ist, dass also in den Herzen mit Omapatrilat

(10^{-7} M) keine bessere myokardiale Oxygenierung stattfand. Zum anderen zeigen die niedrigen Laktatkonzentrationen während der Reperfusion und der Arbeitsphasen, dass allen Gruppen ein ausreichendes Sauerstoffangebot zur Verfügung stand.

Als Folge des oxidativen Stresses bei Reperfusion wird eine gewisse Entkopplung der mitochondrialen Atmungskette diskutiert. Daraus resultiert eine schlechte Effizienz der Herzarbeit (weniger Leistung im Vergleich zum O_2 -Verbrauch). Der myokardiale Sauerstoffverbrauch fiel in allen Gruppen postischämisch ab, zum Ende der zweiten Arbeitsphase ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede der verschiedenen Gruppen im Vergleich zu den Kontrollherzen. Dies spricht für eine effizientere postischämische Herzarbeit der Omapatrilat (10^{-7} M)-Gruppe, denn bei vergleichbaren O_2 -Verbrauchswerten zeigten diese eine signifikant bessere Herzfunktion. Auch hier ergeben sich demnach Hinweise darauf, dass Omapatrilat den oxidativen Stress bei Reperfusion mindert.

IV.2 Methodenkritik

IV.2.1 Das Modell des isoliert perfundierten Herzens

Das Modell des isoliert perfundierten Säugetierherzens wurde erstmalig 1895 von Oskar Langendorff beschrieben (Langendorff 1895) und wird seither, teilweise modifiziert, für eine Reihe von Fragestellungen und Versuchsanordnungen verwendet. Die Vorteile eines isoliert perfundierten Herzens ergeben sich aus der Vereinfachung des Systems und der Ausschaltung vieler komplizierter Regelkreise und Mechanismen, die bei *in vivo* perfundierten Herzmodellen durch den Gesamtorganismus gegeben sind. Somit kann man sich auf gezielte Aspekte, die selektiv das Organ Herz an sich betreffen, konzentrieren. Allerdings entfernt sich das Modell des isolierten Herzens einen Schritt weg vom *in vivo* - Modell und daraus gewonnene Erkenntnisse können nicht ohne weiteres direkt auf den Gesamtorganismus übertragen werden (Sutherland & Hearse 2000).

IV.2.2 Herzpräparation

Die Präparation eines Herzens ist notwendigerweise mit einer temporären Kälte-Kardioplegie verbunden, um eine ischämische Schädigung des Myokards während der Präparation möglichst gering zu halten. Trotz praktischer und zeitlicher Optimierung des Präparationsverfahrens traten bei den Herzen direkt nach der Präparation u. a. Arrhythmien als Zeichen einer myokardialen elektrophysiologischen Dysfunktion auf. Um die Versuche möglichst nicht durch diese vorübergehenden Störungen zu beeinflussen, wurden alle Herzen vor Versuchsbeginn 30 - 45 Minuten im Langendorff-Modus belassen, um sich in dieser Einschlagphase von den „Strapazen“ der Präparation erholen zu können.

IV.2.3 Perfusionsbedingungen und Dauer der Versuchsphasen

Die Bestimmung der idealen Vor- und Nachlast (12 cmH₂O bzw. 80 cmH₂O) für isoliert arbeitende Meerschweinchenherzen stützte sich auf die vielzähligen Erfahrungswerte unseres Labors, die in etwa denen der Literatur entsprechen (Sutherland & Hearse 2000).

Zur Bestimmung eines geeigneten Zeitraums für die beiden Arbeitsphasen dienten Daten aus vorangegangenen Arbeiten (Becker, Bardenheuer, et al. 1984), die eine Dauer von etwa 20 Minuten als ideale Zeitspanne für das Erreichen eines funktionellen „steady state“ für die Herzen beschreiben. Eine geringe Ausdehnung der Arbeitsphasen auf 25 Minuten führte in dieser Versuchsreihe zu einer weiteren Stabilisierung der Werte.

Die Ischämiedauer ergab sich aus einer Reihe von Vorversuchen. Nachdem eine für vergleichbare Versuchsprotokolle durchaus übliche normotherme, globale Ischämiedauer von 15 Minuten eine zu starke Schädigung (Erholung des postischämischen Herzminutenvolumens von durchschnittlich nur 15 %) verursachte, (siehe Abb. IV.2) wurde die Ischämiezeit auf 10 Minuten gekürzt. Mit einer 10-minütigen Ischämie wurden adäquate postischämische Erholungswerte (55 % in Kontrollen) erreicht. Eine so gewählte Ischämiedauer induzierte einerseits nicht zu starke Funktionseinbußen, ließ andererseits jedoch eine Erholung und einen sichtbaren Therapieerfolg zu.

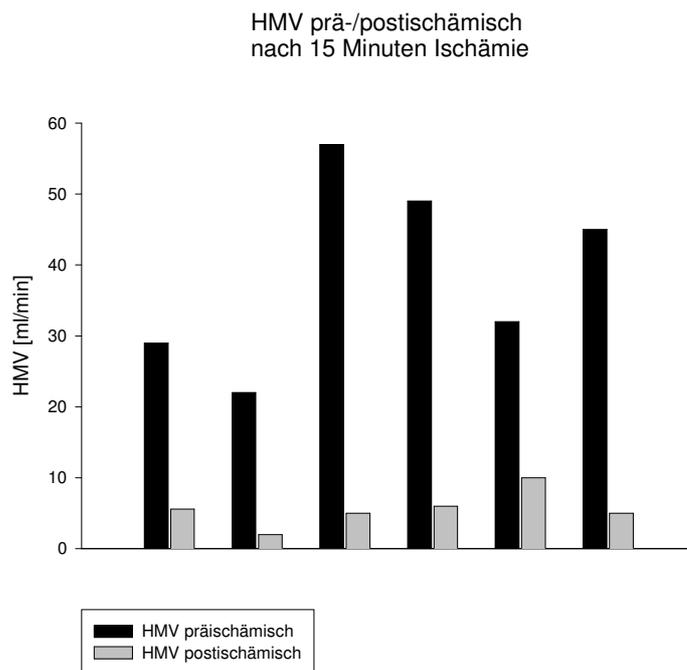


Abb. IV.2: HMV vor und nach 15 Minuten Ischämie; Daten von 6 einzelnen Vorversuchen zur Bestimmung der optimalen Ischämiedauer.

Die Reperfusionphase soll den Herzen eine Erholung von der Ischämie vor einer erneuten Arbeitsphase ermöglichen. Im Gegensatz zur häufig verwendeten druckkonstanten Langendorff-Reperfusion wurde hier ein flusskonstanter Perfusionsmodus gewählt. Die festgelegten 5 ml Perfusionsfluss pro Minute entsprechen knapp den Koronarflussmengen nicht arbeitender, druckkonstant perfundierter Meerschweinchenherzen. Im Gegensatz zur normalen reaktiven Hyperämie bietet eine regulierte O₂-Zufuhr, wie es im Rahmen einer flusskonstanten Reperfusion der Fall ist, eine bessere Grundlage zur postischämischen Erholung (Massoudy, Mempel, et al. 1999). Eine Reperfusionsdauer von 15 Minuten erwies sich in mehreren vorausgegangenen Studien als sinnvoll (Massoudy, Becker, et al. 1994; Massoudy, Becker, et al. 1995).

IV.2.4 Perfusionsdauer und Stabilität des Präparates

Ein gewisser Leistungsabfall der Herzen ist allein durch die Perfusionsdauer zu erwarten. Um dies beurteilen zu können wurden in Versuchsreihen unseres Labors

Herzen ohne Ischämie einer Zeitkontrolle unterzogen. Diese Studien erbrachten einen Funktionsverlust von ca. 5% pro Stunde (Mempel 2000). Ähnliche Werte (5-10 %) sind auch aus anderen Studien bekannt (Sutherland & Hearse 2000).

IV.2.5 Transsudatmessung

Transsudat stellt im Modell des isoliert perfundierten Herzens eine Mischung aus interstitieller und lymphatischer Flüssigkeit dar, die sich an der epikardialen Oberfläche sammelt und vom Präparat abtropft. Um die koronare Netto-Filtration anhand derartig gemessener Transsudatwerte bestimmen zu können, bedarf es einer hohen Qualität der Präparation (Gefäßligaturen). Basalwerte von etwa 160 µl/min in Kontrollherzen sind jedoch als realistisch zu betrachten und sind vergleichbar mit den Transsudatmengen anderer Studien an Meerschweinchenherzen (Kupatt, Zahler, et al. 1996).

IV.3 Mögliche klinische Relevanz der Ergebnisse

Der Ischämie-/Reperfusionsschaden tritt bei einer Reihe von Krankheitsbildern, aber auch zunehmend bei therapeutischen Interventionen, v. a. in der Transplantations-, Herz- und Gefäßchirurgie auf. Um die Therapie zu optimieren wird nach Möglichkeiten gesucht, den Schaden durch Ischämie und Reperfusion möglichst gering zu halten. Dies kann je nach Situation und angestrebter Behandlung u. a. durch eine Applikation von Medikamenten in einem definierten Zeitfenster geschehen.

Durch eine erwiesene Kardioprotektion von Omapatrilat in der Situation eines akuten Ischämie-Reperfusionsschadens gäbe es, ähnlich wie für die selektiven ACE-Hemmer eine Reihe von Einsatzmöglichkeiten, wie Zusatz zur Kardioplegielösung, Verabreichung nach Myokardinfarkt, bei Angioplastien usw.. Allerdings scheint es geboten, die Applikation vor der Reperfusion vorzunehmen; denn in unseren Studien konnten wir keine Kardioprotektion erkennen, wenn Omapatrilat zu einem späteren Zeitpunkt gegeben wurde.

Problematisch erscheint die mögliche Induktion eines Bradykinin-vermittelten Angioödems und eines vaskulären Lecks durch ANP. Omapatrilat zeigte sich in vielen präklinischen und auch in einigen klinischen Studien als ein viel versprechendes, neues, suffizienteres Therapeutikum bei der Behandlung des arteriellen Hypertonus sowie der Herzinsuffizienz. Leider erwies sich das Nebenwirkungsprofil als zu risikoreich und stellte damit die Vorteile von Omapatrilat in den Hintergrund. In der OVERTURE-Studie trat das von den ACE-Hemmern bekannte Angioödem ca. 3-mal häufiger auf, als bei den mit Enalapril behandelten Patienten (Coats 2002). Dafür verantwortlich gemacht werden die durch eine kombinierte ACE- und NEP-Hemmung additiv erhöhten Bradykinin-Spiegel (Nussberger, Cugno, et al. 1998; Messerli & Nussberger 2000).

Die in unseren Versuchen aufgetretene koronare Permeabilitätszunahme durch Omapatrilat legt nun einen gemeinsamen Effekt von Bradykinin und ANP nahe. Dass die durch ANP induzierte Leckentstehung ein Bradykinin-vermitteltes Ödem zusätzlich beeinflussen kann, scheint zwingend. Berichte über eine starke Permeabilitätszunahme und eine damit verbundene Entwicklung eines Lungenödems bei schnell ansteigenden ANP-Spiegeln unterstützen diese These (Spodick 1989).

Die Bestrebungen müssen nun dahingehend sein, diese potentiell lebensbedrohliche Nebenwirkung vor einem weiteren therapeutischen Einsatz weiter abzuklären.

V. Zusammenfassung

V.1 Ziel der Studie

Omapatrilat (Vanlev™) ist der prominenteste Vertreter der Vasopeptidase-Inhibitoren, die eine neue Medikamentenklasse darstellen. Vasopeptidase-Inhibitoren hemmen neben dem Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) auch die neutrale Endopeptidase (NEP). Dieses Enzym trägt zur Inaktivierung von Bradykinin bei und ist wesentlich am Abbau der natriuretischen Peptide ANP, BNP und CNP beteiligt. Selektive ACE-Hemmer (verminderte Bildung von Angiotensin II und Hemmung des BK-Abbaus) stellen derzeit einen Grundpfeiler in der Therapie der arteriellen Hypertonie und der Herzinsuffizienz dar. Weitere Anwendungsgebiete sind das Management nach Myokardinfarkt, sowie die Verminderung des myokardialen Ischämie-/Reperfusionsschadens. Somit könnten die Vasopeptidase-Inhibitoren eine zusätzliche kardioprotektive Wirkung vermitteln. Ziel dieser Studie war es, eine durch Omapatrilat induzierte Kardioprotektion nach globaler Ischämie und nachfolgender Reperfusion zu eruieren und im Falle einer Verbesserung der postischämischen Herzfunktion die daran beteiligten Mechanismen zu klären.

V.2 Material und Methoden

Zur Erfassung der hämodynamischen Parameter wurden isolierte, Druck-Volumen-Arbeit verrichtende Meerschweinchenherzen herangezogen. Alle Herzen wurden einer globalen normothermen Ischämie von 10 Minuten unterzogen, auf die eine 15-minütige Reperfusion, sowie eine zweite Arbeitsphase folgte. Neben der Kontrollgruppe, die das Protokoll ohne Zugabe von Substanzen durchlief, wurden Herzen mit Omapatrilat 10^{-7} M bzw. 10^{-8} M perfundiert, sowie mit Omapatrilat 10^{-7} M,

jedoch erst mit Einsetzen der Reperfusion. Zur Beurteilung des Anteils der Bradykinin-vermittelten Kardioprotektion wurde Omapatrilat 10^{-7} M zusammen mit HOE 140, einem Bradykinin-Rezeptor-Antagonisten appliziert. Der selektive ACE-Hemmer Captopril enthält, wie Omapatrilat eine Sulfhydryl-Gruppe im Molekül und sollte zur Quantifizierung eines SH-vermittelten antioxidativen Schutzmechanismus dienen. Eine letzte Gruppe wurde mit exogenem ANP 10^{-9} M behandelt.

Neben den hämodynamischen Werten dienten die Meerschweinchenherzen auch zur Bestimmung von metabolischen Parametern, wie des O_2 -Metabolismus, der Laktat- und Pyruvatfreisetzung, sowie der Bildung von cGMP.

Da keine Meerschweinchen-spezifischen Nachweismethoden für die Bestimmung von ANP, pro-ANP und TNF- α zur Verfügung standen, wurden zur Analyse des Einflusses von Omapatrilat auf diese vasoaktiven Substanzen Rattenherzen herangezogen.

V.3 Ergebnisse

Die mit Omapatrilat 10^{-7} M behandelten Meerschweinchenherzen zeigten eine signifikant bessere Erholung der äußeren Herzarbeit, verglichen mit den Kontrollherzen. Auch die Effizienz der kardialen Arbeitsleistung nach Ischämie war mit 10^{-7} M Omapatrilat verbessert. Eine niedrigere Konzentration (10^{-8} M), sowie eine Verabreichung von Omapatrilat (10^{-7} M) erst mit Einsetzen der Reperfusion zeigte keine kardioprotektive Wirkung. Wurde Omapatrilat (10^{-7} M) zusammen mit dem Bradykinin-Rezeptor-Blocker Icatibant (HOE 140) verabreicht, fiel die mit Omapatrilat erreichte verbesserte Erholung unter Signifikanzniveau ab. Herzen, die mit exogenem ANP 10^{-9} M perfundiert wurden, profitierten nicht in gleichem Maße. Der ACE-Hemmer Captopril (10^{-7} M) konnte keine eindeutige Verbesserung erzielen. Interessanterweise wurde durch Zugabe von Omapatrilat, sowie von exogenem ANP eine Permeabilitätszunahme im Koronarsystem ausgelöst, die sich in einem gesteigerten Transsudatfluss niederschlug. In den mit Omapatrilat behandelten Herzen ließen sich postischämisch erhöhte Spiegel an ANP [1-28] messen. Die postischämischen Anstiege des pro-ANP-Fragments [1-30] und von TNF- α zeigten keinen statistisch signifikanten Einfluss von Omapatrilat.

Während exogenes ANP eine gesteigerte Abgabe von cGMP induzierte, tat Omapatrilat dies nicht.

V.4 Schlussfolgerung

Omapatrilat zeigte in der hier verwendeten Versuchsanordnung eine kardioprotektive Wirkung auf reperfusionsgeschädigtes Myokard. Diese kam in einer Verbesserung der prozentualen Erholung der äußeren Herzarbeit zum Ausdruck. Die Omapatrilat-vermittelte Protektion war abhängig von der Konzentration (10^{-7} M), sowie vom Applikationszeitpunkt (Verabreichung präischämisch, mit Beginn der ersten Arbeitsphase). Die Sulfhydryl-Gruppe im Omapatrilat-Molekül, die potentielle antioxidativen Eigenschaften besitzt, konnte alleine keine erkennbare verbesserte Erholung bewirken. Bradykinin ist, ähnlich wie bei der selektiven ACE-Hemmung schon beschrieben, an einer Kardioprotektion nach Ischämie und Reperfusion beteiligt, konnte aber in diesem Falle nicht allein für die signifikante Verbesserung der postischämischen Herzfunktion aufkommen. Ebenso konnte der mit einer Hemmung der neutralen Endopeptidase verbundene Anstieg von ANP die protektive Wirkung von Omapatrilat nicht alleine bewirken.

So scheinen mehrere Mediatoren an einer Kardioprotektion mit Omapatrilat beteiligt zu sein. Ein additiver Effekt von Bradykinin, den natriuretischen Peptiden und spekulativ weiteren möglichen Substraten der neutralen Endopeptidase könnte die Wirkung von Omapatrilat erklären.

Omapatrilat verursachte neben seinen benefiziellen Effekten auf die postischämische Herzfunktion auch eine Steigerung der myokardialen mikrovaskulären Permeabilität. Dies zeigte sich in einer Transsudatzunahme in den mit Omapatrilat behandelten Herzen. Exogenes ANP hatte einen ähnlichen Effekt. Ob nun diese durch Omapatrilat induzierte Permeabilitätszunahme auf einen gemeinsamen Effekt von Bradykinin und den natriuretischen Peptiden zurückzuführen ist und diese Mechanismen an einem häufigeren Auftreten des Angioödems als unerwünschter Nebenwirkung von Omapatrilat beteiligt sind, bleibt zu klären.

VI. Abkürzungsverzeichnis

A.:	Arteria
Abb:	Abbildung
AF:	Aortenfluss
ACE:	Angiotensin-Converting-Enzyme
ANP:	Atrial-natriuretic-peptide
AW:	Beschleunigungsarbeit (acceleration work)
AS:	Aminosäure
AT I:	Angiotensin I
AT II:	Angiotensin II
ATP:	Adenosintriphosphat
BK:	Bradykinin
BNP:	Brain-natriuretic-peptide
CF:	Koronarfluss (coronary flow)
CNP:	C-type-natriuretic-peptide
cGMP:	zyklisches Guanosinmonophosphat
CO ₂ :	Kohlendioxid
Da:	Dalton (g/mol), Einheit der molekularen Masse
DNP:	Dendroaspis natriuretic peptide
ECE:	Endothelin-converting-enzyme
EIA:	enzyme-immuno-assay
ET:	Endothelin
gr:	Gramm
HMV:	Herzminutenvolumen
HPLC:	High pressure liquid chromatography
HR:	Herzfrequenz (heart rate)
Kap.:	Kapitel
LDH:	Laktatdehydrogenase
LVFP:	linksventrikulärer Füllungsdruck
M:	mol/l

MVO ₂ :	Sauerstoffverbrauch
n:	Anzahl der Versuche
NEP:	neutrale Endopeptidase
NO:	Stickstoffmonoxid
NP:	natriuretische Peptide
NPR-A:	Natriuretic-peptide-receptor-A
NPR-B:	Natriuretic-peptide-receptor-B
NPR-C:	Natriuretic-peptide-receptor-C
NPS:	Natriuretic peptide system
O ₂ :	Sauerstoff
PAF:	platelet activating factor
PGC:	particulate guanylyl cyclase
PTCA:	perkutane transluminale koronare Angioplastie
PVW:	Druck-Volumenarbeit (pressure-volume-work)
RAAS:	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
Rep:	Reperfusion
RIA:	radio-immuno-assay
SEM:	Standardfehler
SH-:	Sulfhydryl-Gruppe
SV:	Schlagvolumen
TACE:	TNF- α -cleaving-enzyme
TNF- α :	Tumor necrosis factor- α
TS:	Transsudat
V.:	Vena
VPI:	Vasopeptidase-Inhibitor
vs.:	versus
W1:	Arbeitsphase 1
W2:	Arbeitsphase 2
WK:	Windkessel

VII. Abbildungsverzeichnis

Abbildung I.1: Struktur des humanen Angiotensin-Converting-Enzymes (ACE) aus Johnston Cl. Tissue angiotensin converting enzyme in cardiac and vascular hypertrophy, repair, and remodeling. *Hypertension* 1994; **23**:258-268.

Abbildung I.3: Struktur der humanen neutralen Endopeptidase (mit Phosphoramidon) aus: <http://www.rcsb.org>, am 15.08.03

Abbildung I.4: Struktur der natriuretischen Peptide aus Burnett JC Jr. Vasopeptidase inhibition: a new concept in blood pressure management. *J Hypertens* 1999; **17** (Suppl 1): S37-S43.

Abbildung I.5 : Chemische Struktur von Omapatrilat aus Weber MA. Vasopeptidase inhibitors. *Lancet*. 2001; **358**:1525-1532.

VIII. Literaturverzeichnis

Ambrosio G, Tritto I. Reperfusion injury: experimental evidence and clinical implications. *Am Heart J* 1999; **138**:S69-S75.

Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, Ward PA. Ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res* 2002; **105**:248-258.

Ando S, Rahman MA, Butler GC, Senn BL, Floras JS. Comparison of candoxatril and atrial natriuretic factor in healthy men. *Hypertension* 1995; **26**:1160-1166.

Arad M, Shotan A, Horowitz L, Klein R, Rabinovitz B. Effects of Captopril on metabolic and hemodynamic alterations in global ischemia and reperfusion in the isolated working rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992; **19**:319-323.

Barr CS, Rhodes P, Struthers AD. C-type natriuretic peptide. *Peptides* 1996; **17** (7):1243-1251.

Becker BF, Bardenheuer H, Overhage de Reyes I, Gerlach E. Effects of theophylline on dipyridamole-induced coronary venous adenosine release and coronary dilation. In: Stefanovich V, Rudolphi K, Schubert P (Hrsg.). Adenosine: Receptors and modulation of cell function. *IRL Press Limited, Oxford, London*. 1984: 441-451.

Becker BF, Massoudy P, Permanetter B, Raschke P, Zahler S. Mögliche Bedeutung von Sauerstoffradikalen für den Reperfusionsschaden. *Z Kardiol* 1993; **82** (Suppl.5):49-58.

Becker BF, Reinholz N, Leipert B, Raschke P, Gerlach E. Sind Radikalfänger-Eigenschaften von ACE-Inhibitoren mit Sulfhydrylgruppen bei therapeutisch wirksamen Konzentrationen von quantitativer Bedeutung? *Klin Wochenschr* 1991; **69** (Suppl.XXIV):6-9.

Becker BF, Möbert J. Low-dose calcium antagonists reduce energy demand and cellular damage of isolated hearts during both ischemia and reperfusion. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1999; **360**:287-294.

Beltowski J. N-terminal atrial natriuretic peptides. *Postepy Hig Med Dosw* 2000; **54** (6):895-914.

Berlowitz DR, Ash AS, Hickey EC, Friedman RH, Glickman M, Kader B, Moskowitz MA. Inadequate management of blood pressure in a hypertensive population. *N Engl J Med* 1998; **339**:1957-1963.

Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev.* 1992 Mar; **44** (1):1-80.

Blais C, Lapointe N, Rouleau JF, Clément R, Gervais N, Geadah D, et al. Effects of the vasopeptidase inhibitor Omapatrilat on cardiac endogenous kinins in rats with acute myocardial infarction. *Peptides* 2001; **22**:953-962.

Boix F. Vasopeptidase inhibitors: a bradykinin link. *Lancet* 2002; **359**:1157.

Bolli R. Postischemic myocardial "stunning": pathogenesis, pathophysiology and clinical relevance.

In Yellon DM, Jennings RB (Hrsg.): Myocardial protection. The pathophysiology of reperfusion and reperfusion injury. *New York: Raven Press* 1992: 105-150.

Bolli R, Jeroude MO, Paterl BS, Hartley CJ, Thornby JI, Roberts R. Direct evidence, that oxygen-derived free radicals contribute to postischemic myocardial dysfunction in the intact dog. *Troc Natl. Acad. Sci. USA* 1989; **86**:4695-4699.

Bolli R, Marbán E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev* 1999; **79**:609-634.

Brown J, Chen Q, Hong G. An autocrine system for C-type natriuretic peptide within rat carotid neointima during arterial repair. *Am J Physiol* 1997; **272**:H2919-2931.

Bünger R, Sommer O, Walter G, Stiegler H, Gerlach D. Functional and metabolic features of an isolated perfused guinea pig heart performing pressure-volume work. *Pflügers Arch.* 1979; **380**:259-266.

Burnett JC Jr. Vasopeptidase inhibition: a new concept in blood pressure management. *J Hypertens* 1999; **17** (Suppl 1): S37-S43.

Campbell DJ. Vasopeptidase-Inhibition A double-edged sword? *Hypertension.* 2003; **41**:1-7.

Caput D, Beutler B, Hartog D, Thayer T, Brown-Shimer S, Cerami A. Identification of a common nucleotide sequence in the 3' untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**:1670-1674.

Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *J Pathol* 2000; **190**:255-266.

Cargnoni A, Boraso A, Scotti C, Ghirardelli N, Benigno M, Bernocchi P, et al. Effect of angiotensin converting enzyme inhibition with quinaprilat on the ischemic and reperfused myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 1994; **26**:69-86.

Chen HH, Burnett JC Jr. C-type natriuretic peptide. The endothelial component of the natriuretic peptide system *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; **32** (Suppl.3):S22-S28.

Chiou S, Vesely DL. Kaliuretic Peptide: the most potent inhibitor of Na⁺-K⁺-ATPase of the atrial natriuretic peptides. *Endocrinology* 1995; **136**:2033-2039.

Chu A, Cobb FR. Effects of atrial natriuretic peptide on proximal epicardial coronary arteries and coronary blood flow in conscious dogs. *Circ Res* 1987; **61**:485-491.

Clavell AL, Stingo AJ, Wie CM, Heublein DM, Burnett JC Jr. C-type natriuretic peptide: a selective cardiovascular peptide. *Am J Physiol* 1993; **264**:R290-R295.

Cleland JGF, Swedberg K. Lack of efficacy of neutral endopeptidase inhibitor ecadotril in heart failure. *Lancet* 1998; **351**:1657-1658.

Coats AJS. Omapatrilat-the story of Overture and Octave. *Int J Cardiol* 2002; **86**:1-4.

Colucci WS, Elkayam U, Horton DP, Abraham WT, Bourge RC, Johnson AD et al. Intravenous nesiritide, a natriuretic peptide, in the treatment of decompensated congestive heart failure. Nesiritide Study Group. *N Engl J Med*. 2000; **343**:246-253.

Corti R, Burnett JC, Rouleau JL, Ruschitzka F, Lüscher TF. Vasopeptidase inhibitors: A new therapeutic concept in cardiovascular disease? *Circulation* 2001; **104**:1856-1862

De Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract. *Life Sciences* 1981; **28**:89-94.

Dietz JR, Nazian SJ, Vesely DL. Release of ANF, proANF 1-98, and proANF 31-67 from isolated rat atria by atrial distension. *Am J Physiol* 1991; **260**: H1774-H1778.

Döring HJ, Dehnert H. The isolated perfused warm-blood heart according to Langendorff. *Reprint of the First Ed. Biomesstechnik-Verlag March GmbH, March* 1987.

D'Souza SP, Yellon DM, Martin C, Schulz R, Heusch G, Onody A et al. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; **284**:H1592-H1600.

Dumoulin MJ, Adam A, Blais C Jr., Lamontagne D. Metabolism of bradykinin by the rat coronary vascular bed. *Cardiovasc Res* 1998; **38**:229-236.

Dumoulin MJ, Adam A, Rouleau JL, Lamontagne D. Comparison of a vasopeptidase inhibitor with neutral endopeptidase and angiotensin-converting enzyme inhibitors on bradykinin metabolism in the rat coronary bed. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001; **37**:359-366.

Dzau VJ, Bernstein K, Celermajer D, Cohen J, Dahlöf B, Deanfield J et al. Working group on tissue angiotensin converting enzyme, international society of cardiovascular pharmacotherapy. Pathophysiologic and therapeutic importance of tissue ACE: a consensus report. *Cardiovasc Dr Ther* 2002; **16**:149-160.

Emanuelli C, Grady EF, Madeddu P, Figini M, Bunnett MW, Parisi D et al. Acute ACE inhibition causes plasma extravasation in mice. That is mediated by bradykinin and substance P. *Hypertension* 1998; **31**:1299-1304.

Erdös EG, Skidgel RA. Neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) and related regulators of peptide hormones. *FASEB J* 1989; **3**:145-151.

Erdös EG. Some old and some new ideas on kinin metabolism. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990; **15** (suppl. 6): S20-S24.

Ertl G, Kloner RA, Alexander RW, Braunwald E. Limitation of experimental infarct size by angiotensin converting enzyme inhibition. *Circulation* 1982; **65**:40-48.

Eriksson U, Danilczyk U, Penninger JM. Just the beginning: Novel functions for angiotensin-converting enzymes. *Current Biology* 2002; **12**:R745-R752.

Ferro CJ, Spratt JC, Haynes WG, et al. Inhibition of neutral endopeptidase causes vasoconstriction of human resistance vessels in vivo. *Circulation*. 1998; **97**:2323-2330.

Fox KA. Reperfusion injury: laboratory phenomenon or clinical reality? *Cardiovasc Res* 1992; **26**:656-659.

Gao WD, Liu W, Mellgren R, Marban E. Intrinsic myofilament alterations underlying the decreased contractility of stunned myocardium: a consequence of Ca²⁺-dependent proteolysis? 1996; **78**:455-465.

Gao WD, Atar D, Liu Y, P GN, Murphy AM, Marban E. Role of troponin I proteolysis in the pathogenesis of stunned myocardium. *Circ Res.* 1997; **80**:393-399.

Gebhard MM. Myocardial protection and ischemia tolerance of the globally ischemic heart. *Thorac Cardiovasc Surg* 1990; **38**: 55-59.

Goldschmidt JE, Tallrida RJ. Pharmacological evidence that Captopril possesses an endothelium-mediated component of vasodilation: effect of sulfhydryl groups on endothelium-derived relaxing factor. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; **257**:1136-1145.

Gunning ME, Brady HR, Otuechere G, Brenner BM, Ziedel ML. Atrial natriuretic peptide (31-67) inhibits Na⁺ transport in rabbit inner medullary collecting duct cells: role of prostaglandin E₂. *J Clin Invest* 1992; **89**:1411-1417.

Gurevitch J, Frolkis I, Yuhas Y, Paz Y, Matsa M, Mohr R, Yakirevich V. Tumor necrosis factor-alpha is released from the isolated heart undergoing ischemia and reperfusion. *J Am Coll Cardiol.* 1996; **28**:247-252.

Gurevitch J, Pevni D, Frolkis I, Matsa M, Paz Y, Mohr R, Yakirevich V. Captopril in cardioplegia and reperfusion: protective effects on the ischemic heart. *Ann Thorac Surg* 1997; **63**:627-633.

Hall C, Aaberg L, Stokke O. In vitro stability of N-terminal proatrial natriuretic factor in unfrozen samples; an important prerequisite for its use as a biochemical parameter of atrial pressure in clinical routine. *Circulation* 1995; **91**:911.

Hansen PR. Role of neutrophils in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation* 1995; **91**:1872-18.

Hartman JC. The role of bradykinin and nitric oxide in the cardioprotective action of ACE inhibitors. *Ann Thorac Surg* 1995; **60**:789-792.

Hayashi M, Tsutamoto T, Wada A, Maeda K, Mabuchi N, Tsutsui T, Horie H, Ohnishi M, Kinoshita M. Intravenous atrial natriuretic peptide prevents left ventricular remodelling in patients with first anterior acute myocardial infarction. *JAAC* 2001; **37**:1820-1826.

Hearse DJ, Bolli R. Reperfusion induced injury: manifestations, mechanisms and clinical relevance. *Cardiovasc Res* 1992; **26**: 101-108.

Hecker M, Bara AT, Bauersachs J, Busse R. Characterization of endothelium-derived hyperpolarizing factor as a cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolite in mammals. *J Physiol (Lond)*. 1994; **481**:407-414.

Hirose M, Furukawa Y, Kurogouchi F, Nakajuma K, Miyashita Y, Chiba S. C-type natriuretic peptide increases myocardial contractility and sinus rate mediated by guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors in isolated, blood-perfused dog heart preparations. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; **286**:70-76.

Hölschermann H, Noll T, Hempel A, Piper HM. Dual role of cGMP in macromolecule permeability of aortic endothelial cells. *Am J Physiol* 1997; **272**:H91-H98.

Hu RM, Levin AR, Pedram A, Frank HJ. Atrial natriuretic peptide inhibits the production and secretion of endothelin from cultured endothelial cells. *J Biol Chem* 1992; **267**:17384-17389.

Inserte J, Garcia-Dorado D, Agulló L, Paniagua A, Soler-Soler J. Urodilatin limits acute reperfusion injury in the isolated rat heart. *Cardiovasc Res* 2000; **45**:351-359.

Itoh H, Pratt RE, Dzau VJ. Atrial natriuretic polypeptide inhibits hypertrophy of vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1990; **86**: 1690-1697.

Itoh H, Nadao K, Sugawara A, Saito Y, Mukoyama M, Morri N, et al. Gamma-atrial natriuretic polypeptide (gamma ANP)-derived peptides in human plasma: cosecretion of N-terminal gamma ANP fragment and α -ANP. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; **67**:429-437.

Kenny AJ, Bourne A, Ingram J. Hydrolysis of human and pig brain natriuretic peptides, urodilatin, C-type natriuretic peptide and some C-receptor ligands by endopeptidase 24.11. *J Biol Chem* 1993, **291**:83-88.

Kentsch M, Otter W, Drummer C, Nötges A, Gerzer R, Müller-Esch G. Neutral endopeptidase 24.11 inhibition may not exhibit beneficial haemodynamic effects in patients with congestive heart failure. *Eur J Clin Pharmacol*. 1996; **51**:269-272.

Kokkonen JO, Lindstedt KA, Kuoppala, Kovanen PT. Kinin-degrading pathways in the human heart. *Trends Cardiovasc Med* 2000; **10**:42-45.

Komaru T, Kanatsuka H, Shirato K. Coronary microcirculation physiology and pharmacology. *Pharmacology & Therapeutics* 2000; **86**:217-261.

Korn P, Kröner A, Schirnhöfer J, Hallström S, Bernecker O, Mallinger R et al. Quinaprilat during cardioplegic arrest in the rabbit to prevent ischemia-reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2002; **124**:352-360.

Ksander GM, Savage P, Trapani AJ, Balwierczak JL, Jeng AY: Benzofused macrocyclic lactams as triple inhibitors of endothelin-converting enzyme, neutral endopeptidase 24.11, and angiotensin-converting enzyme. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; **31** (suppl. 1):S71-S73.

Kupatt C, Zahler S, Seligmann C, Massoudy P, Becker BF, Gerlach E. Nitric oxide mitigates leukocyte adhesion and vascular leak after myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 1996; **28**:643-654.

Lamontagne D, König A, Bassenge E, Busse R. Prostacyclin and nitric oxide contribute to the vasodilator action of acetylcholine and bradykinin in the intact rabbit coronary bed. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1992; **20**:652-657.

Langendorff O. (1895) Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen. *Pflügers Arch.* **61**:291-332.

Lapointe N, Blais C Jr., Adam A, Parker T, Sirois MG, Gosselin H et al. Comparison of the effects of an angiotensin-converting enzyme inhibitor and a vasopeptidase inhibitor after myocardial infarction in the rat. *J Am Coll Cardiol* 2002; **39**:1692-1698.

Lazar HL, Volpe C, Bao Y, Rivers S, Vita JA, Deane JF Jr. Beneficial effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors during acute revascularisation. *Ann Thorac Surg* 1998; **66**:487-492.

Lazar HL, Bao Y, Rivers S, Colton T, Bernard SA. High tissue affinity angiotensin-converting enzyme inhibitors improve endothelial function and reduce infarct size. *Ann Thorac Surg* 2001; **72**:548-54.

Lazar HL, Bao Y, Rivers S, Bernard SA. Pretreatment with angiotensin-converting enzyme inhibitors attenuates ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 2002; **73**:1522-1527.

Levin ER, Gardner DG, Samson WK. Natriuretic peptides. *N Engl J Med* 1998; **339** (5):321-328.

Lesnefsky EJ, Dauber IM, Horwitz LD. Myocardial sulfhydryl pool alterations occur during reperfusion after brief and prolonged myocardial ischemia in vivo. *Circulation Research* 1991; **68**:605-613

Linz W, Schölkens BA. Influence of local converting enzyme inhibition on angiotensin and bradykinin effects in ischemic rat hearts. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1987; **10** Suppl.7:S75-82.

Linz W, Wiemer G, Schölkens BA. ACE-inhibition induces NO-formation in cultured bovine endothelial cells and protects isolated ischemic rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1992; **24**:909-919.

Linz W, Wiemer G, Gohlke P, Unger T, Schölkens BA. Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Pharmacol Rev* 1995; **47** (1):25-49.

Lisy O, Jougasaki M, Schirger JA, Chen HH, Barclay PT, Burnett JC Jr. Neutral endopeptidase inhibition potentiates the natriuretic actions of adrenomedullin. *Am J Physiol* 1998; **275**: F410-F414.

Lisy O, Jougasaki M, Heublein DM, Schirger JA, Chen HH, Wennberg PW, Burnett JC Jr. Renal actions of synthetic Dendroaspis natriuretic peptide. *Kidney Int.* 1999; **56**:502-508.

Lofton CE, Mewnam WH, Currie MG. Atrial natriuretic peptide regulation of endothelial permeability is mediated by cGMP. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; **172**:793-799.

Lum H Malik AB. Regulation of vascular endothelial barrier function. *Am J Physiol* 1994; **11**:L223-L241.

Maisel AS, Krishnaswamy P, Mowak RM, McCord J, Hollander JE, Duc P et al. Rapid measurement of B-Type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure. *N Engl J Med* 2002; **347** (3):161-167.

Martin DR, Pevahouse JB, Trigg DJ, Vesely DL, Buerkert JE. Three peptides from the ANF prohormone NH₂-terminus are natriuretic and/or kaliuretic. *Am J Physiol* 1990; (**258**):F1401-1408.

Massoudy P, Becker BF, Gerlach E. Bradykinin accounts for improved postischemic function and decreased glutathione release of guinea pig heart treated with the angiotensin-converting enzyme inhibitor ramiprilat. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994; **23**:632-639.

Massoudy P, Becker BF, Gerlach E. Nitric oxide accounts for postischemic cardioprotection resulting from angiotensin-converting enzyme inhibition. Indirect

evidence for a radical scavenger effect in isolated guinea pig heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; **25**:440-447.

Massoudy P, Zahler S, Kupatt C, Reder E, Becker BF, Gerlach E. Cardioprotection by Cyclosporine A in experimental ischemia and reperfusion – evidence for a nitric oxide-dependent mechanism mediated by endothelin. *J Mol Cell Cardiol* 1997; **29**: 535-544.

Massoudy P, Mempel T, Raschke P, Becker BF. Reduction of oxygen delivery during post-ischemic reperfusion protects the isolated guinea pig heart. *Basic Res Cardiol* 1999; **94**:231-237.

Mempel TR. Wirkungen von Erythrozyten am Herzen in der postischämischen Reperfusion. *Dissertation zum Erwerb der Doktorgrades der Medizin an der Medizinischen Fakultät der LMU München*; 2000.

Messerli FH, Nussberger J. Vasopeptidase inhibition and angio-oedema. *The Lancet* 2000; **356**:608-609.

Meyer DJ Jr, Huxley VH. Capillary hydraulic conductivity is elevated by cGMP-dependent vasodilators. *Circulation Research* 1992; **70**:382-391.

Molinaro G, Rouleau JL, Adam A. Vasopeptidase inhibitors: a new class of dual zinc metallopeptidase inhibitors for cardiorenal therapeutics. *Current opinion in Pharmacology*. 2002; **2**:131-141.

Mukoyama M, Nakao K, Obata K, Jougasaki M, Yoshimura M, Morita E, Hosoda K, Suga S, Ogawa Y, Yasue H, Imura H. Augmented secretion of brain natriuretic peptide in acute myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991; **180**:431-436.

Murphy LJ, Corder R, Mallet AI, Turner AJ. Generation by the phosphoramidon-sensitive peptidases, endopeptidase-24.11 and thermolysin, of endothelin-1 and C-terminal fragment from big endothelin-1. *Br J Pharmacol* 1994; **113**:137-142.

Nagaya N, Satoh R, Nishikimi T, Uematsu M, Furuichi S, Sakamaki et al. Hemodynamic, renal, and hormonal effects of adrenomedullin infusion in patients with congestive heart failure. *Circulation* 2000; **101**:498-503.

Naruse M, Takeyama Y, Tanabe A, Hiroshige J, Naruse K, Yoshimoto T. Atrial and brain natriuretic peptides in cardiovascular diseases. *Hypertension* 1994; **23** (suppl I):I231-I-234.

Nawarskas J, Rajan V, Frishman WH. Vasopeptidase Inhibitors, Neutral Endopeptidase Inhibitors, and Dual Inhibitors of Angiotensin-Converting Enzyme and Neutral Endopeptidase. *Heart Disease* 2001; **3** (6):378-385.

Nussberger J, Cugno M, Amstutz C, Cicardi M, Pellacani A, Agostoni A. Plasma bradykinin in angio-oedema. *Lancet* 1998; **351**:1693-1697.

Okawa H, Horimoto H, Mieno S, Nomura Y, Nakahara K, Yoshida M et al. Preischemic infusion of alpha-human atrial natriuretic peptide elicits myoprotection through a nitric oxide-dependent mechanism. *J Cardiol* 2002; **39** (6):299-304.

Onuoha GN, Alpar EK. Plasma levels of N-terminal peptide of pro-atrial natriuretic peptides in myoskeletal injuries. *Regulatory Peptides* 2001; **99**:17-20.

Packer M, Califf RM, Konstam MA, Drum H, McMurray JJ, Rouleau JL et al. Comparison of Omapatrilat and Enalapril in patients with chronic heart failure: the Omapatrilat Versus Enalapril Randomized Trial of Utility in Reducing Events (OVERTURE). *Circulation*. 2002; **106**:920-926.

Park JL, Lucchesi BR. Mechanisms of myocardial reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 1999; **68**:1905-1912.

Patel AR, Konstam MA. Recent advances in the treatment of heart failure. *Circ J* 2002; **66**:117-121.

Pepine CJ. The effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on endothelial dysfunction: potential role in myocardial ischemia. *Am J Cardiol* 1998; **82** (10A):32S-27S.

Pernow J, Wang QD. Endothelin in myocardial ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc Res* 1997; **33**:518-526.

Pfeffer MA, Braunwald E, Moye LA, Basta L, Brown EJ Jr, Cuddy TE, Davis BR, Geltman EM, Goldman S, Flaker GC, et al. Effect of Captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. *N Engl J Med*. 1992 Sep 3; **327**(10):669-677.

Pi XJ, Chen X. Captopril and ramiprilat protect against free radical injury in isolated working rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1989; **21**:1261-1271.

Piper HM, Siegmund B, Ladilov YV, Schlüter KD. Myocardial protection during reperfusion. *Thorac cardiovasc Surgeon* 1996; **44**:15-19.

Piper HM, García-Dorado D, Ovize M. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1998; **38**:291-300.

Podesser BK, Schirnhofner J, Bernecker OY, Kröner A, Franz M, Semsroth S, Fellner B. et al. Optimizing ischemia/reperfusion in the failing rat heart – improved myocardial protection with acute ACE inhibition. *Circulation*. 2002; **106** (suppl I):I-277-I-283.

Quaschnig T, Corti R, Ruschitzka FT, Noll G, Lüscher TF. Vasopeptidase-Inhibitoren - klinische Implikationen einer neuen Medikamentenklasse. *Dtsch. Med. Wschr*. 2000; **125**:499-503.

Rastegar MA, Végh Á, Papp JG, Parratt JR. Atrial natriuretic peptide reduces the severe consequences of coronary artery occlusion in anaesthetized dogs. *Cardiovasc Dr Ther* 2000; **14**:471-479.

Raut R, Rouleau JL, Blais C Jr, Gosselin H, Molinaro G, Sirois MG et al. Bradykinin metabolism in the postinfarcted rat heart: role of ACE and neutral endopeptidase 24.11. *Am J Physiol* 1999; **276**:H1769-H1779.

Regoli D, Barabé J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev* 1980; **32**:1-46.

Richards AM, Wittert GA, Crozier IG, Espiner EA, Yandle TG, Ikram H, Frampton C. Chronic inhibition of endopeptidase 24.11 in essential hypertension: evidence for enhanced atrial natriuretic peptide and angiotensin II. *J Hypertens* 1993; **11**:404-416.

Robl JA, Sun CQ, Stevenson J, Ryono DE, Simpkins LM, Cimarusti MP et al. Dual metalloprotease inhibitors: mercaptoacetyl-based fused heterocyclic dipeptide mimetics as inhibitors of angiotensin-converting enzyme and neutral endopeptidase. *J Med Chem* 1997; **40**:1570-1577.

Roques BP, Noble F, Daugé V, Fournié-Zaluski M-C, Beaumont A. Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1993; **45**: 87-146.

Rouleau JL, Pfeffer MA, Stewart DJ, Isaac D, Sestier F, Kerut ED, et al. Comparison of vasopeptidase inhibitor, Omapatrilat, and Lisinopril on exercise tolerance and morbidity in patients with heart failure: IMPRESS randomised trial. *Lancet.* 2000; **356**:615-620.

Ruschitzka F, Corti R, Noll G, Lüscher TF. A rationale for treatment of endothelial dysfunction in hypertension. *J Hypertens Suppl* 1999 Feb; **17**(1): S25-35.

Sagnella GA. Atrial natriuretic peptide mimetics and vasopeptidase inhibitors. *Cardiovasc Res* 2001; **51**:416-428.

Schirger JA, Heublein DM, Chen HH, Lisy O, Jougasaki M, Wennberg PW, Bennett JC Jr. Presence of Dendroaspis natriuretic peptide-like immunoreactivity in human plasma and its increase during human heart failure. *Mayo Clin Proc.* 1999; **74**:126-130.

Schoemaker RG, Debets JJM, Struyker-Boudier HAJ, Smits JFM. Delayed but not immediate Captopril therapy improves cardiac function in conscious rats, following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 1991; **23**:187-197.

Schweitz H, Vigne P, Moinier D, Frelin C, Lazdunski M. A new member of the natriuretic peptide family is present in the venom of the green mamba (*Dendroaspis angusticeps*). *J Biol Chem* 1992; **267** (20):13928-13932.

Sheth T, Parker T, Block A, Hall C, Adam A, Pfeffer MA et al. Comparison of the effects of Omapatrilat and Lisinopril on circulating neurohormones and cytokines in patients with chronic heart failure. *Am J Cardiol.* 2002; **90**:496-500.

Skeggs, LT. The preparation and function of the hypertensin converting enzyme. *J. Exp. Med* 1956; **103**: 295-299.

Spodick DH. Atrial natriuretic peptide and pulmonary oedema. *N Engl J Med* 1989; **320**:671.

Stein BC, Levin RI. Natriuretic peptides: Physiology, therapeutic potential, and risk stratification in ischemic heart disease. *Am Heart J* 1998; **135**:914-923.

Stroht U, Unger T. The renin-angiotensin system and its receptors. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999; **33** (suppl. 1):S21-S28.

Sutherland FJ, Hearse DJ. The isolated blood and perfusion fluid perfused heart. *Pharmacol Res* 2000; **41**:613-627.

Takagi G, Kiuchi K, Endo T, Yamamoto t, Sato N, Nejima J, Takano T. α -human atrial natriuretic peptide, carperitide, reduces infarct size but not arrhythmias after coronary occlusion/reperfusion in dogs. *J Cardiovasc Phar* 2000; **36**:22-30.

Takata Y, Hirayama Y, Kiyomi S, Ogawa T, Iga K, Ishii T, Nagai Y, Ibukiyama C. The beneficial effects of atrial natriuretic peptide on arrhythmias and myocardial high-energy phosphates after reperfusion. *Cardiovas Res* 1996; **32**:286-293.

Takeda H, Takashi H, Kikuchi K. Protective effect of the angiotensin-converting enzyme inhibitor Captopril on postischemic myocardial damage in perfused rat heart. *Jpn Circ J* 1997; **61**:687-694.

Thomas CV, McDaniel GM, Holzgrefe HH, et al. Chronic dual inhibition of angiotensin-converting enzyme and neutral endopeptidase during the development of left ventricular dysfunction in dogs. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; **32**:902-912.

Those B, Kanno M. Human atrial natriuretic peptide decreases cardiac calcium currents through activation of cGMP-dependent protein kinase. *Eur J Pharmacol* 1993; **61**(suppl 1):272 (Abstr.).

Trippodo BC, Robl JA, Asaad MM, Fox M, Panchal BC, Schaeffer TR. Effects of Omapatrilat in low, normal, and high renin experimental hypertension. *Am J Hypertens*. 1998; **11**:363-372.

Turner AJ, Murphy LJ. Molecular Pharmacology of endothelin converting enzymes. *Biochem Pharmacol* 1996; **51**:91-102.

Veelken R, Schmieder RE. Neutral endopeptidase inhibition: the potential of a new therapeutic approach in cardiovascular disease evolves. *J Hypertens* 2002; **20**:599-603.

Verma S, Fedak PWM, Weisel RD, Butany J, Rao V, Maitland A et al. Fundamentals of reperfusion injury for the clinical cardiologist. *Circulation* 2002; **105** (20):2332-2342.

Vesely DL, Cornett LE, MacLeod SL, Nash AA, Norris JS, Specific binding site for prohormone of atrial natriuretic peptides 1-30, 31-67 and 99-126. *Peptides* 1990; **11**:193-197.

Vesely DL, Perez-Lamboy GI, Schocken DD. Vessel dilator, long acting natriuretic peptide, and kaliuretic peptide increase circulating prostaglandin E2. *Life Sciences* 2000; **66**:905-913.

Vesely DL, Dietz JR, Parks JR et al. Comparison of vessel dilator and long acting natriuretic peptide in the treatment of congestive heart failure. *Am Heart J* 1999; **138**:625-632.

Vesely DL. Atrial natriuretic peptides in pathophysiological diseases. *Cardiovasc Res* 2001; **51**:647-658.

Vijayaraghavan J, Scicli AG, Carretero OA, Slaughter C, Moomaw C, Hersh LB. The hydrolysis of endothelins by neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase). *J Biol Chem* 1990; **265**:14450-14155.

Wang QD, Pernow, Sjöquist PO, Rydén L. Pharmacological possibilities for protection against myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2002; **55**:25-37.

Weber MA. Vasopeptidase inhibitors. *Lancet*. 2001; **358**:1525-1532.

Wei CM, Aarhus LL, Miller VM, Burnett JC Jr. Action of C-type natriuretic peptide in isolated canine arteries and veins. *Am J Physiol* 1993; **264**(1Pt 2):H71-H73.

Wennberg P, Miller VM, Rabelink T, Burnett JC. Further attenuation of endothelium-dependent relaxation imparted by natriuretic peptide receptor antagonism. *Am J Physiol* 1999; **277**:H1618-H1621.

Wiemer G, Schölkens BA, Becker RHA, Busse R. Ramiprilat enhances endothelial autacoid formation by inhibiting breakdown of endothelium-derived bradykinin. *Hypertension* 1991; **18**:558-563.

Wijeyaratne CN, Moulton PJA. The effect of α -human atrial natriuretic peptide on plasma volume and vascular permeability in normotensive subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; **76**:343-346.

Wilkins MR, Redondo J, Brown LA. The natriuretic-peptide family. *Lancet* 1997; **349**:1307-1310.

Yang HYT, Erdös EG, Levin Y. Characterization of a dipeptide hydrolase (kininase II: Angiotensin I converting enzyme). *J Pharmacol Exp Ther* 1971; **177**:291-300.

Yonemaru M, Ishii K, Murad F, Raffin TA. Atriopeptin-induced increases in endothelial cell permeability are associated with elevated cGMP levels. *Lung Cell Mol Physiol* 1992; **7**:L363-L369.

Yousef ZR, Redwood SR, Marber MS. Postinfarction left ventricular remodeling: a pathophysiological and therapeutic review. *Cardiovasc Drugs Ther* 2000; **14**(3): 243-52.

Zahler S, Kupatt C, Becker BF. ACE-inhibition attenuates cardiac cell damage and preserves release of NO in the postischemic heart. *Immunopharmacology* 1999; **44**:27-33.

Zhang X, Scicli GA, Xu X, Nasjletti A, Hintze TH. Role of endothelial kinins in control of coronary nitric oxide production. *Hypertension* 1997; **30**:1105-1111.

IX. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Pohl danke ich für die Möglichkeit, an seinem Institut die Dissertation durchführen zu können.

Mein herzlichster Dank gilt meinem „Doktorvater“ Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Bernhard F. Becker, der mir das Thema der Arbeit überließ und die unmittelbare Betreuung übernahm. Mit Erfahrung, Engagement und Geduld stand er mir jederzeit zur Seite.

Herrn Priv. Doz. Dr. rer. biol. hum. Stefan Zahler danke ich für die fachkundige Unterstützung sowie die kritische Durchsicht der Manuskripte.

Wesentlichen Anteil am Gelingen vor allem der Herzpräparationen hatte Veronika Frei, die am Institut als medizinisch-technische Assistentin tätig war. Mit unglaublicher Geduld und sehr viel Geschick assistierte sie bei einem Grossteil der Herzpräparationen. Auch in allen anderen labortechnischen Dingen war sie stets über die Maßen hilfsbereit und trug allzeit zu einem sehr guten Arbeitsklima bei.

Frau Dora Kiesel danke ich für die Übernahme sämtlicher HPLC-Messungen.

Meinen Mitstreitern im Doktorandenteam Jan Reil, Tim Eiser, Vera Gonscherowski, und Steffi Gilles, sowie Frau Dr. med. Julia Voigtländer, die auch in unserer Arbeitsgruppe tätig war, gebührt ebenfalls ein herzliches Dankeschön. Alle zusammen sorgten stets für eine gute Stimmung und halfen, so manchem „grauen“ Labortag eine gute Wendung zu geben. Zudem trug ein reger kollegialer Informationsaustausch in allen Bereichen des Labor- und Alltagsleben zum Gelingen der Arbeit bei.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, die mir das Studium und damit die Promotion ermöglichten und besonders meinem Mann Tobias für die tatkräftige Unterstützung in allen computertechnischen Ausweglosigkeiten (z. B. Viruseliminierung), in denen mein eigener Geduldsfaden des Öfteren auf die Zerreißprobe gestellt wurde.

X. Lebenslauf

Jutta Bienefeld

Geburtsdatum/ -ort

13.05.1977 in Kempten (Allgäu)

Eltern

Rotraut Bienefeld, OStR´a. D.

Franz-Josef Bienefeld, StD a. D.

Familienstand

verheiratet mit Tobias Hartmann, Dipl. Ing.; CPL-H.

Schulbildung:

1983 – 1987	Grundschule Buchenberg
1987 – 1996	Hildegardis-Gymnasium Kempten
28.06.1996	Abiturprüfung

Hochschulbildung:

seit Mai 1997	Studium der Medizin an der LMU München
März 1999	Ärztliche Vorprüfung
März 2000	1. Staatsexamen
März 2002	2. Staatsexamen
November 2003	3. Staatsexamen