

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

DISSERTATION

**Die Regulation der ANP-Freisetzung  
bei Herzinsuffizienz**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin  
Berlin

von

Angela Nikola Model

aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. R. Willenbrock  
2. Prof. Dr. R. Schwinger  
3. Priv.-Doz. Dr. med. A. Luchner

Datum der Promotion: 12.09.2005

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen.....	4
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>6</b>
1.1 Pathophysiologie der Herzinsuffizienz .....	6
1.1.1 Kardiales Remodeling .....	7
1.1.2 Die Proteinkinase C .....	9
1.1.3 Das kardiale Gefäßsystem .....	11
1.1.4 Neuroendokrine Aktivierung .....	11
1.2 Die natriuretischen Peptide .....	12
1.2.1 Rezeptoren .....	13
1.2.2 Wirkungen .....	15
1.2.3 Kinetik .....	16
1.3 Fragestellungen .....	20
<b>2. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>21</b>
2.1 Tierhaltung .....	21
2.2 Aortokavaler Shunt .....	21
2.3 Organentnahme .....	22
2.4 Arbeit am isoliert schlagenden Herzen .....	23
2.4.1 Perfusionsprinzip .....	23
2.4.2 Technische Umsetzung .....	24
2.4.3 Versuchsdurchführung .....	25
2.5 Bestimmung der diskutierten Parameter .....	27
2.5.1 Koronarperfusion .....	27
2.5.2 ANP-Konzentration .....	27
2.5.3 ANP-Sekretion .....	27
2.6 Statistische Auswertung .....	28
<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>29</b>
3.1 Daten zum Shuntmodell .....	29
3.1.1 Herzgewicht .....	29
3.1.2 ANP – Sekretion .....	30
3.1.3 ANP – Konzentration .....	31
3.1.4 Koronarperfusion .....	32
3.2 Versuch A: Analyse der dehnungsinduzierten ANP-Freisetzung .....	33
3.2.1 ANP-Sekretion .....	33
3.2.2 ANP – Konzentration .....	34
3.2.3 Koronarperfusion .....	36
3.3 Versuch B: Stimulation der Proteinkinase C .....	37
3.3.1 ANP - Sekretion .....	37
3.3.2 ANP – Konzentration .....	39
3.3.3 Koronarperfusion .....	40

<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>41</b>
4.1 Daten zum Shuntmodell .....	41
4.1.1 Herzgewicht .....	41
4.1.2 ANP – Freisetzung .....	42
4.1.3 ANP – Konzentration .....	44
4.1.4 Koronarperfusion .....	45
4.2 Versuch A: Analyse der dehnungsinduzierten ANP-Freisetzung .....	46
4.2.1 ANP – Freisetzung .....	46
4.2.2 Koronarperfusion .....	47
4.2.3 ANP – Konzentration .....	48
4.3 Versuch B: Stimulation der Proteinkinase C.....	49
4.3.1 ANP – Freisetzung .....	49
4.3.2 Integrative Diskussion der Parameter .....	51
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>54</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>56</b>
<b>7. DANKSAGUNG .....</b>	<b>74</b>
<b>8. ERKLÄRUNG AN EIDES STATT .....</b>	<b>74</b>
<b>9. LEBENSLAUF .....</b>	<b>75</b>

## Abkürzungen

<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>ADH</b>	antidiuretisches Hormon = Vasopressin
<b>Ang II</b>	Angiotensin II
<b>ANP</b>	atriales natriuretisches Peptid
<b>ATP</b>	Adenosintrisphosphat
<b>BNP</b>	brain natriuretic peptide
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcium Ion
<b>cAMP</b>	zyklisches Adenosinmonophosphat
<b>cGMP</b>	zyklisches Guanosinmonophosphat
<b>CNP</b>	C-type natriuretic peptide
<b>DAG</b>	Diacylglycerol
<b>DNP</b>	D-type natriuretic peptide
<b>eNOS</b>	endotheliale NO-Synthase
<b>ET-1</b>	Endothelin 1
<b>FGF</b>	fibroblast growth factor
<b>GC</b>	Guanylatzyklase
<b>GPgR</b>	G-Protein gekoppelter Rezeptor
<b>IGF</b>	insuline like growth factor
<b>IL</b>	Interleukin
<b>iNOS</b>	induzierbare NO-Synthase
<b>IP3</b>	Inositoltrisphosphat
<b>LD</b>	Langendorff-Modus (retrograd)
<b>MAPK</b>	mitogenaktivierte Proteinkinase
<b>NO</b>	Stickstoffmonoxid
<b>NP</b>	natriuretisches Peptid
<b>NPR</b>	natriuretisches Peptid Rezeptor
<b>PIP2</b>	Phosphatidylinositolbisphosphat
<b>PKC</b>	Proteinkinase C
<b>PLC</b>	Phospholipase
<b>PMA</b>	Phorbol-12-Myristat-13-Azetat
<b>RAAS</b>	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
<b>TGF</b>	transforming growth factor
<b>TNF</b>	Tumornekrosefaktor
<b>VEGF</b>	vascular endothelial growth factor
<b>WH</b>	Working-Heart-Modus (anterograd)

# 1. EINLEITUNG

Die Herzinsuffizienz bezeichnet den pathophysiologischen Zustand, in dem eine gestörte kardi-ale Funktion für das Unvermögen des Herzens verantwortlich ist, das Blut dem Bedarf der meta-bolisierenden Gewebe entsprechend auszuwerfen, und/oder dies nur durch ein erhöhtes diastoli-sches Volumen möglich ist.<sup>1</sup>

Zusammen mit kardiovaskulären Erkrankungen wie der chronisch ischämischen Herzkrankheit und dem akuten Myokardinfarkt stellte sie im Jahr 2001 rund 26% der Gesamtmortalität in Deutschland<sup>2</sup> und ist damit eine der schwerwiegendsten medizinischen sowie ökonomischen Herausforderungen an das Gesundheitssystem. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, fokussierend auf das atriale natriuretische Peptid, zur weiteren Erforschung der pathophysiologischen Vor-gänge bei der Herzinsuffizienz beizutragen.

## **1.1 Pathophysiologie der Herzinsuffizienz**

Die Vorstellung von den krankheitsprozessfördernden Vorgängen bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz unterlag in der Vergangenheit gravierenden Veränderungen<sup>3</sup> und ist weiterhin Gegenstand intensiver Forschung. Derzeit wird entsprechend der neurohormonalen Hypothese davon ausgegangen, dass als Antwort auf ein primär schädigendes Ereignis (index event) endo-gene Neurohormone und Zytokine in ihrer Freisetzung variiert werden und somit strukturelle und funktionelle Veränderungen am Herzen (kardiales Remodeling) hervorrufen. Diese können über einen gewissen Zeitraum zur Ausbildung klinischer Symptome der Herzinsuffizienz füh-ren.<sup>3</sup> Verschiedenste Formen von Herzkrankheit wie Myokardinfarkt, Klappendefekte und Myo-karditiden oder auch Zustände, die zu einer Überwässerung des Körpers führen wie z.B. bei Nie-reninsuffizienz, können ein derartiges index event darstellen. Am häufigsten scheint das Herz-versagen mit Berufung auf die Framingham-Studie aus koronarer Herzerkrankung und arterieller Hypertonie zu resultieren.<sup>4,5</sup>

Bei akuter Belastung des Herzens (Minuten bis Stunden) stehen zur Aufrechterhaltung der Pumpfunktion vor allem der Frank-Starling-Mechanismus und die Aktivierung noradrenerger kardialer Nerven als Adaptationsmechanismen zur Verfügung.<sup>6</sup> Der Frank-Starling-Mechanismus besagt, dass es durch Erhöhung des enddiastolischen Volumens mit konsekutiver Dehnung der Ventrikelwand zu einer Längenzunahme intramyozytär gelegener Sarkomere kommt. Die dadurch gesteigerte Kalzium-Sensitivität kontraktile Filamente bewirkt am gesun-

den Herzen eine Erhöhung der myokardialen Kontraktilität. Im herzinsuffizienten Zustand ist dieser Effekt abgeschwächt.<sup>7</sup> Die Freisetzung von Noradrenalin an kardialen sympathischen Nervenendigungen bewirkt ebenfalls eine Kontraktilitätssteigerung des Myokards und verstärkt das bei Herzinsuffizienz aktivierte Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), wodurch der arterielle Blutdruck und die Perfusion lebenswichtiger Organe aufrechterhalten werden können.<sup>6</sup>

Bei chronischem Missverhältnis zwischen der Belastung des Herzens und seiner Pumpfunktion kommt es stromaufwärts, das heißt hinter dem initial betroffenen Ventrikel, zu einem Rückstau des Blutes (Rückwärtsversagen). Mit ansteigender Druckdifferenz zwischen intravasalem und extravasalem Raum tritt dann intravasale Flüssigkeit ins Interstitium über und es kommt zur klinischen Manifestation von Ödemen in den vorgeschalteten Körperpartien. Chronische Salz- und Wasserretention wird auch durch eine Minderperfusion der Nieren (Vorwärtsversagen) sowie durch die RAAS-Aktivierung hervorgerufen. Klinisch führt die Überwässerung des Körpers zu dem Hauptbeschwerdebild der chronischen Herzinsuffizienz – der Atemnot. Durch Flüssigkeits-einlagerung in das Lungengewebe kommt es zu einem erschwerten Gasaustausch und folglich zum Auftreten von Dyspnoe vor allem bei Belastung und in liegender Position.<sup>1</sup> Je nach Schweregrad der Erkrankung stellt die hierdurch bedingte Einschränkung der körperlichen Belastbarkeit bis hin zur Erstickungsangst eine enorme Minderung der Lebensqualität dar. Körpereigene Substanzen wie die natriuretischen Peptide wirken einer Salz- und Wasserretention entgegen und besitzen dadurch therapeutisches Potential. Eine pharmakologische Ausnutzung ihrer Kapazität war bisher nur eingeschränkt möglich, sodass auf diesem Gebiet weiterer Forschungsbedarf besteht. Das derzeitige Behandlungskonzept der Wassereinlagerung stützt sich vor allem auf eine Trinkmengenbeschränkung, die Gabe von Diuretika und teilweise auf die Antagonisierung des RAAS. In der Regel führt dies zu einer Besserung der Symptomatik. Trotzdem kommt es in den meisten Fällen fortgeschrittener Erkrankung zur wiederholten Dekompensation mit Flüssigkeitsretention und weiterführend zur chronischen Belastung des Herzens.

### **1.1.1 Kardiales Remodeling**

Chronisch starke Überbeanspruchung des Herzens führt zu einer Vielzahl struktureller Veränderungen des Herzgewebes. Dazu gehören unter anderem kardiozytäre Apoptose und die Aktivierung spezifischer myokardialer Matrix-Metallo-Proteinasen, die am Abbau des kollagenen Netzwerkes beteiligt sind. Dieses unterstützt im gesunden Zustand die dreidimensionale Anord-

nung der Kardiomyozyten. Unter mechanischem Stress kann es dann zu einem Auseinanderdriften der Kardiomyozyten („myocyte slippage“) kommen, welches zur pathologischen Ventrikeldilatation beiträgt.

Seit langem bekannt ist auch die Zunahme des Herzgewichts bei Patienten mit Herzinsuffizienz. Dafür scheinen ein robustes Wachstum interstitieller Matrix und myozytäre Hypertrophie verantwortlich zu sein, aber auch kardiomyozytäre Hyperplasie wurde von einigen Autoren beschrieben.<sup>3</sup>

Über die Hypertrophie als Reaktion der Herzmuskelzellen auf mechanischen Stress liegen bisher die ausführlichsten Informationen vor. Resultiert diese aus einer verstärkten Druckbelastung (Afterload) mit Zunahme der systolischen Wandspannung, entsteht infolge paralleler Neubildung von Myofibrillen eine konzentrische Hypertrophie.<sup>8,9</sup> Ein vermehrtes Volumenangebot (Preload) mit Zunahme der Wandspannung während der Diastole bedingt durch Bildung neuer hintereinander liegender Sarkomere eine exzentrische Hypertrophie.<sup>8,10-13</sup> Bei dem in der vorliegenden Arbeit angewandten Modell des aortokavalen Shunts führt dieser Mechanismus zur Entwicklung der kardialen Hypertrophie und Insuffizienz.

Zur Erforschung der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz dienen außerdem noch andere Modelle, wobei zur Induktion der Herzinsuffizienz mit den verschiedensten primär schädigenden Ereignissen gearbeitet wird. Zur Diskussion der vorliegenden Versuche wurden beispielsweise Daten herangezogen, die an Infarktmodellen, genetisch bedingter Kardiomyopathie, experimentell induzierter Klappeninsuffizienz, medikamentöser Hypertonie und anderen Modellen der Herzinsuffizienz im Tierversuch gewonnen wurden.

Unabhängig von der auslösenden Ursache steigert kardiale Hypertrophie das Risiko eines plötzlichen Herztodes bzw. der fortschreitenden Entwicklung zur Herzinsuffizienz deutlich.<sup>14-16</sup>

Mechanische Belastung führt dabei über eine komplexe Interaktion von extra- und intrazellulärer Matrix zur Aktivierung diverser, teilweise untereinander vernetzter Signalkaskaden, welche auf Transkriptionsebene zum Teil konvergieren und letztendlich zu den hypertrophietypischen morphologischen Veränderungen führen. Die Wahrnehmung von mechanischem Stress scheint in diesem Kontext über verschiedene zelluläre Proteine realisiert zu werden, u.a. Titin und Integrine. Die Expression von Integrinen ist im herzinsuffizienten Zustand erhöht. Kardiale Fibroblasten besitzen außerdem die Fähigkeit, auf mechanische Stimulation hin auto- und parakrine Faktoren wie Endothelin 1 (ET-1) und Angiotensin II (Ang II) freizusetzen. Diese und weitere Faktoren, wie der VEGF (vascular endothelial growth factor) und TGF $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ), amplifizieren einen durch mechanische Dehnung getriggerten Wachstumsstimulus und wirken derart förderlich auf die Entwicklung einer Herzhypertrophie.<sup>17</sup> Auch  $\alpha_1$ -

adrenerge Agonisten<sup>18,19</sup> und Wachstumsfaktoren wie fibroblast growth factors (FGFs)<sup>20,21</sup> und insuline like growth factor 1 (IGF1)<sup>22-24</sup> wirken hypertroph auf kardiale Myozyten. Durch die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden kommt es infolgedessen zu einem globalen Ansteigen der Proteinsyntheserate, der transienten Induktion von sogenannten „early genes“ (c-jun, c-fos, Egr-1) und chronisch zur Rekapitulation fetaler Genprogramme.<sup>25-28</sup> Letzteres umfasst die Reinduktion der fetalen Formen kontraktile Proteine, das Absinken der Ca<sup>2+</sup>-ATPase am sarkoplasmatischen Retikulum sowie die Hochregulation ventrikulärer natriuretischer Peptidexpression.<sup>28,29</sup> Bei den kontraktile Proteinen und der Ca<sup>2+</sup>-ATPase wurden Unterschiede zwischen druck- und volumeninduzierter Hypertrophie festgestellt, wogegen ANP (das atriale natriuretische Peptid) bei beiden Hypertrophieformen verstärkt in den Ventrikeln gebildet wird.<sup>29</sup>

In die intrazelluläre Vermittlung dieser modifizierten Genexpression sind mehrere Transduktionswege involviert (in Übersicht beschrieben von Frey und Olson<sup>30</sup>). An der Zellmembran betrifft dies mehrere Ionenkanäle, neurohormonelle Rezeptoren und rezeptorassoziierte G-Proteine. Diese bewirken Veränderungen im zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Haushalt und führen zur Modulation der Aktivität komplex interagierender intrazellulärer Proteine. Dazu gehören z.B. Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin, die Proteinkinase C, Phosphoinositid 3-Kinasen und die Proteinkinase A, welche über angeschlossene Signalkaskaden letztendlich mit regulativen Einheiten hypertrophieassoziiierter Gene kommunizieren und so zur einer Abwandlung deren Expressionsmuster führen.

Da der Proteinkinase C eine ausschlaggebende Rolle bei der Expression und Freisetzung atrialer natriuretischer Peptide zugeschrieben wird, soll auf ihre Struktur und Wirkungsweise im Folgenden ausführlicher eingegangen werden.

### **1.1.2 Die Proteinkinase C**

Die ubiquitär exprimierte Proteinkinase C (PKC) ist ein Schlüsselenzym, das in die Regulation diverser zellulärer Prozesse, wie Wachstum, Differenzierung, Metabolismus, Sekretion und glatte Gefäßmuskelkontraktion eingebunden ist. Sie stellt ein Bindeglied zwischen hypertrophen sowie antihypertrophen Stimuli und vielfältigen Effektorproteinen sowie Genregulatoren dar und spielt somit eine zentrale Rolle bei der Entstehung einer Herzinsuffizienz. Ihre Stimulation führte in kardiomyozytären Zellkulturen<sup>171,229</sup> sowie am isoliert perfundierten Herzmodell<sup>230</sup> zu einer Steigerung der ANP-Freisetzung. Kongruent dazu wurde ANP von atrialen Myozyten durch PKC-Inhibition vermindert freigesetzt.<sup>223</sup> Zahlreiche Faktoren, die eine ANP-Freisetzung fördern, vermitteln ihre Wirkung über die Proteinkinase C.<sup>31</sup>

Es sind 11 Isoformen der PKC bekannt, die je nach Aktivierungsmodus in 3 verschiedene Subklassen unterteilt werden:

- 1) die *konventionellen* (cPKC:  $\alpha$ ,  $\beta_{1/2}$ ,  $\gamma$ ; aktiviert durch  $\text{Ca}^{2+}$  und Diacylglycerol (DAG)),
- 2) die *neuartigen* (nPKC:  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ; aktiviert durch DAG) und
- 3) die *atypischen* Proteinkinasen vom C-Typ (aPKC:  $\zeta$ ,  $\lambda$ ; aktiviert durch Phospholipide).<sup>31-33</sup>

Die Zuteilung der PKC $\mu$  ist in der Literatur unklar definiert und ihr Aktivierungsgang erscheint komplexer als jener der anderen PKC-Subtypen.

Da für die verschiedenen Isoformen immunhistochemisch unterschiedliche intrazelluläre Lokalisationen nachgewiesen wurden<sup>34</sup>, ist zu vermuten, dass sich auch ihre zellulären Funktionen unterscheiden. In humanem Myokard demonstrierten Bowling et al.<sup>35</sup> das Vorhandensein von konventionellen und neuartigen PKC-Typen in Form von PKC $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$ . Kerkelä et al.<sup>36</sup> zeigten eine Beteiligung der PKC $\alpha$  an der Regulation hypertropher Genexpression und der Freisetzung natriuretischer Peptide. Auch für die Isoformen  $\beta$  und  $\epsilon$  existieren deutliche Hinweise auf ein Eingebundensein in die Vermittlung hypertropher Stimuli.<sup>35,37</sup>

Für die PKC-Aktivierung wurden mehrere Möglichkeiten vorgeschlagen.<sup>38</sup> Der etablierteste und in den Prozess kardialer Hypertrophieentwicklung involvierte Aktivierungsmodus wird durch Ligand-Rezeptor-Interaktionen an G-Proteingekoppelten Rezeptoren (GPgRs) ausgelöst.<sup>31</sup> Die  $\alpha$ -Untereinheit der G-Proteine ist im Stande die Phospholipase  $\beta$  (PLC  $\beta$ ) zu aktivieren, welche membrangebundenes Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Diacylglycerol (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP<sub>3</sub>) spaltet, die mit oben beschriebener Affinität die unterschiedlichen Subklassen der PKC aktivieren. Die Aktivierung durch DAG erfolgt nach dessen Bindung an einer zysteinreichen Struktur (zinc butterfly) in der N-terminalen regulatorischen Domäne der PKC.<sup>38</sup> Dieser Prozess kann durch DAG-Analoga wie PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Azetat) nachgeahmt und für experimentelle Zwecke genutzt werden.<sup>39</sup> Auch bei den vorliegenden Versuchen wurde mit PMA gearbeitet.

Durch Aktivierung translozieren die PKC-Subtypen dann in isoformspezifische Zellregionen und modulieren dort verschiedene Ionenkanäle und -transporter sowie kontraktile Proteine.<sup>38,40</sup> Die in „1.1.1 kardiales Remodeling“ angesprochene Regulation der Genexpression scheint über die Aktivierung spezieller mitogenaktivierter Proteinkinasen (MAPKKK  $\rightarrow$  MAPKK  $\rightarrow$  MAPK) vermittelt zu werden. Sie können Transkriptionsfaktoren wie c-jun und c-fos stimulieren und so die Expression hypertrophieassoziiierter Gene modulieren.<sup>31</sup>

### 1.1.3 Das kardiale Gefäßsystem

Auch in der glatten Muskulatur der Blutgefäße vermittelt die PKC zelluläre Funktionen. Die Aktivierung ihrer  $\epsilon$ -Isoform bewirkt dort eine Vasokonstriktion.<sup>38</sup> Bei der Herzinsuffizienz wird eine gesteigerte Vasokonstriktion als verstärkender Pathomechanismus diskutiert.<sup>41</sup> Studien zur koronaren Ruhedurchblutung bei Herzinsuffizienz lieferten jedoch widersprüchliche Ergebnisse.<sup>42-44</sup> In Zuständen erhöhten metabolischen Bedarfs konnte dagegen ein abgeschwächter Anstieg der Koronarperfusion an Tiermodellen der Herzinsuffizienz gezeigt werden.<sup>45-47</sup>

Im Herzen sind etwa dreimal mehr Endothelzellen zu finden als Herzmuskelzellen, obwohl sie aufgrund ihrer deutlich geringeren Größe nur einige Hundertstel des kardiomyozytären Volumens ausmachen.<sup>48</sup> Organisiert in myokardialen Kapillaren befinden sie sich in unmittelbarer Nähe der Kardiomyozyten, was eine intensive Kommunikation zwischen Herzmuskel und dem Gefäßsystem ermöglicht. So geben sie eine Reihe von Faktoren (wie Endotheline, Angiotensin II, Stickstoffmonoxid und andere) an das Interstitium ab, welche im Stande sind, zu den Herzmuskelzellen zu diffundieren und dort deren Funktion zu modulieren.<sup>41</sup>

### 1.1.4 Neuroendokrine Aktivierung

Im Plasma herzinsuffizienter Individuen liegen zahlreiche, die kardiovaskuläre Funktion beeinflussende Faktoren in erhöhtem Maße vor, welche sich gegenseitig in ihrer Synthese, Freisetzung und Wirkung in komplexer Weise beeinflussen. Dazu gehören Noradrenalin<sup>49,50</sup>, Endothelin 1 (ET-1)<sup>51-53</sup>, Renin und Angiotensin II (Ang II)<sup>54</sup>, sowie das antidiuretische Hormon (ADH)<sup>55</sup>. Sie haben vasokonstriktive, antidiuretische sowie prohypertrophe Eigenschaften und fördern so im Falle abgeschwächter Pumpfunktion des Herzens die Aufrechterhaltung des Blutdrucks und damit die adäquate Perfusion lebenswichtiger Organe. Ihr chronischer Einfluss bewirkt allerdings eine kardiale Mehrbelastung, die im Sinne eines Circulus vitiosus wiederum zur Minderung der Herzfunktion beiträgt.<sup>56</sup> Auch die Plasmaspiegel von Entzündungsmediatoren wie dem Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) und Interleukinen (IL) sind bei Herzinsuffizienz erhöht. Es wurde gezeigt, dass sowohl TNF $\alpha$  als auch IL-1 $\beta$  kardiale Hypertrophie und die Induktion fetalen Genprogrammes stimulieren können.<sup>6</sup>

Biologische Gegenspieler dieses Systems sind die natriuretischen Peptide<sup>57-67</sup>, Stickstoffmonoxid<sup>68</sup>, Adrenomedullin<sup>69-71</sup>, Bradykinine<sup>72</sup> und Prostaglandine<sup>73</sup>. Sie wirken durch natriuretische, diuretische sowie antihypertrophe Effekte kardioprotektiv und sind beim Vorliegen einer Herzin-

suffizienz ebenfalls aktiviert. Mit der Entwicklung einer Herzinsuffizienz kommt es jedoch zum Überwiegen der chronisch herzscheidenden Einflüsse kardiostimulatorischer Faktoren und zur Progredienz der Erkrankung bis hin zum Tod.

Warum kardioprotektive Substanzen diesen Prozess nicht aufhalten können, ist unbekannt. Die Interaktion zwischen den einzelnen Faktoren erscheint komplex und ist mit dem jetzigen Stand der Forschung nur in Ansätzen aufgeklärt. Vor diesem Hintergrund stellen die folgenden Abschnitte das bisherige Wissen über die natriuretischen Peptide und ihre Interaktion mit anderen neurohumoralen Systemen bei der Herzinsuffizienz zusammenfassend dar.

## **1.2 Die natriuretischen Peptide**

Schon 1956 konnten Kirsch et al.<sup>74</sup> in atrialen Zellen elektronenmikroskopisch Granula nachweisen, die denen endokriner Drüsen ähnelten. 1981 führten de Bold et al.<sup>75</sup> dann ein bahnbrechendes Experiment durch, welches zeigte, dass intravenös injizierter Extrakt atrialen Myokardiums eine schnelle und potente natriuretische Antwort bei Ratten hervorrief. Purifikation und Charakterisierung der für diesen Effekt verantwortlichen Substanz führten kurze Zeit später zu der Entdeckung des atrialen natriuretischen Peptids (ANP).<sup>76,77</sup> 1988 wurde ein weiteres natriuretisches Peptid aus Schweinehirn isoliert und entsprechend seines Ursprungsorgans „brain natriuretic peptide“ (BNP) genannt.<sup>78</sup> Spätere Studien zeigten jedoch, dass auch BNP vorwiegend im Herzen synthetisiert wird.<sup>79</sup> Ebenfalls 1988 wurde Urodilatin aus humanem Urin isoliert, analysiert und als Mitglied der natriuretischen Peptidfamilie identifiziert.<sup>80</sup> Urodilatin wird in der Niere freigesetzt und scheint vor allem lokal renale Wirkungen zu vermitteln.<sup>81,82</sup> Zwei Jahre später isolierten Sudoh et al.<sup>83</sup> CNP (C-type natriuretic peptide) aus Schweinehirnzellen. Es wird überwiegend im Gehirn und vaskulären Endothelzellen synthetisiert<sup>84-86</sup> und scheint bei sehr geringen Plasmaspiegeln vornehmlich parakrin zu wirken<sup>87</sup>. Das zuletzt entdeckte natriuretische Peptid ist das DNP (Dendroaspis natriuretic peptide). Es wurde 1992 im Gift der namensgebenden Schlangengattung *Dendroaspis angusticeps* gefunden und später auch in humanem Gewebe nachgewiesen.<sup>88,89</sup> Über seine physiologische Bedeutung ist jedoch noch wenig bekannt.

Zusammenfassend besteht die Familie der natriuretischen Peptide (NP) nach dem derzeitigen Forschungsstand aus fünf Peptidhormonen (ANP, BNP, CNP, DNP und Urodilatin), welche ausgeprägte strukturelle Gemeinsamkeiten aufweisen (Abb.1; DNP ist nicht abgebildet).



tionsänderung des Rezeptorproteins sowie die Aktivierung der Guanylatzyklase (GC) und somit die Bildung des second messengers cGMP (zyklisches Guanosinmonophosphat). Die Aktivierung der Rezeptoren führt im Folgenden zu ihrer Dephosphorylierung. Sie werden auf diesem Wege gegenüber natriuretischen Peptiden desensitiviert, womit die Lösung der Ligand-Rezeptor-Bindung erleichtert wird. Nicht nur der adäquate Ligand ANP selbst, sondern auch andere, in den Krankheitsprozess der Herzinsuffizienz involvierte Substanzen wie ADH, AngII und ET-1 sind im Stande eine Dephosphorylierung des Rezeptormoleküls und damit eine Wirkungsabschwächung natriuretischer Peptide hervorzurufen.<sup>102</sup> Dies erfolgt an anderer Stelle über die Stimulation der Proteinkinase C und bewirkt eine verringerte Bildung von cGMP nach Rezeptoraktivierung durch natriuretische Peptide. Ein weiterer Mechanismus, der die Minderung der ANP-Wirkung bei Herzinsuffizienz erklären könnte, ist die Rezeptordownregulation. Auch hierbei konnte ein Zusammenhang mit insuffizienzkorrelierten Vasokonstriktoren (ADH und AngII) hergestellt werden.<sup>104</sup> Im insuffizienten Herzen wurden erniedrigte Werte für NPR-C-mRNA gemessen, die Transkripte von NPR-A und NPR-B waren dagegen erhöht. In Gefäßmuskelzellen wiesen mehrere Arbeitsgruppen eine Herabregulierung von NP-Rezeptoren in vitro nach. Zur Downregulation renaler NP-Rezeptoren liegen widersprüchliche Daten vor und adrenale Rezeptoren sowie solche in der subfornikalen Region und Area postrema scheinen bei Herzinsuffizienz nicht downreguliert zu werden.<sup>102</sup> Die pathophysiologische Bedeutung dieser Daten ist noch zu evaluieren.

Die Bindung von ANP an NPR-A und -B ist chloridabhängig, wobei eine niedrige Chloridkonzentration die ANP-Bindung blockiert.<sup>105</sup> Dies könnte einen weiteren feed back Mechanismus zur Modulation der ANP-Wirkung darstellen, da hierbei durch eine eingetretene ANP-Wirkung (Kochsalzausscheidung mit entsprechendem Absinken der Chloridkonzentration) die fortlaufende Signalübermittlung vermindert wird.

In den meisten Geweben ist die Dichte des **NPR-C** höher als die von NPR-A und -B; in Endothelzellen z.B. gehören 94% der Rezeptoren zum Typ C.<sup>106</sup> Seine kurze intrazelluläre Domäne besitzt keine Guanylatzyklasefunktion. An den NPR-C binden alle natriuretischen Peptide.<sup>107</sup> Nach der Bindung wird der Ligand-Rezeptor-Komplex internalisiert und das natriuretische Peptid lysosomal hydrolysiert. Der Rezeptor hingegen wird erneut auf der Zelloberfläche exprimiert.<sup>108</sup> Auf diese Weise fungiert der NPR-C als Clearance-Rezeptor für natriuretische Peptide. Zu erwähnen bleibt hierbei, dass es bei NPR-C knockout Mäusen zwar zu einer verlängerten Halbwertszeit von ANP kam, die basalen Plasmaspiegel des Hormons unterschieden sich jedoch nicht von den Wildtyp-Kontrollen.<sup>109</sup> Bei der Regulation der NP-Plasmakonzentration scheinen daher andere Mechanismen eine Rolle zu spielen.

Die Aktivierung des NPR-C führt über inhibitorische G-Proteine auch zu einer Hemmung der Adenylatzyklase mit konsekutiver Senkung der intrazellulären cAMP-Konzentration (zyklisches Adenosinmonophosphat). Auch eine Aktivierung des Phosphoinositol-Weges wurde beobachtet, könnte jedoch auch sekundär zur Wirkung auf die Adenylatzyklase auftreten.<sup>106</sup>

Auch der NPR-C wird in seiner Funktion von Faktoren beeinflusst, welche im Zustand der Herzinsuffizienz in veränderter Konzentration im Plasma vorliegen. Beispielsweise unterdrückt AngII über eine PKC-Aktivierung die NPR-C vermittelte Adenylatzyklasehemmung. Noradrenalin sowie cAMP führen zu einer Rezeptordownregulation.<sup>106</sup>

Der vierte Rezeptor der natriuretischen Peptide, der **NPR-D**, wurde bisher nur in Gehirnzellen des Aals nachgewiesen und ist nicht an eine Guanylatzyklase gekoppelt.<sup>110</sup> Seine biologische Funktion ist nicht bekannt.

### 1.2.2 Wirkungen

Wie die Vielfalt NP-Rezeptor-ausgestatteter Organe schon erahnen lässt, existiert ein weitgefächertes Wirkspektrum der natriuretischen Peptide, wobei ANP und das (infolge ähnlicher Rezeptorpräferenz vergleichbar agierende) BNP im Mittelpunkt der folgenden Abhandlung stehen sollen. Ihre am längsten bekannten Effekte sind **Natriurese und Diurese**.<sup>57,58</sup> Die Steigerung der glomerulären Filtrationsrate (durch Dilatation der afferenten und Konstriktion der efferenten Arteriole)<sup>112</sup> sowie die direkte Hemmung des Na<sup>+</sup>-Transports in proximalem Tubulus und Sammelrohr<sup>113,114</sup> spielen bei der Vermittlung dieser Wirkungen eine Rolle. Ein indirekter Beitrag wird auch dank Antagonisierung der antidiuretischen Wirkung von ADH<sup>115</sup> und des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems geleistet, letzteres mittels Hemmung der Aldosteronfreisetzung sowie der Reninsekretion.<sup>116-118</sup> Diese Antagonisierung der darüber hinaus vasokonstriktorisch wirkenden Substanzen AngII und ADH (und ebenso von ET-1 und Katecholaminen<sup>119</sup>) steuert außerdem einem weiteren wichtigen Aspekt der NP-Wirkung bei: der **Senkung des arteriellen Blutdrucks**. Mäuse, die nicht über ein ANP-Gen verfügen, entwickelten demgemäß eine chronische Hypertonie.<sup>59</sup> Durch Herabsetzung der Katecholaminsynthese und -freisetzung in den Nervenendigungen des Sympathikus beeinflusst ANP direkt die sympathische Modulation des Gefäßtonus. Ferner bewirkt die Aktivierung guanylatzyklasegekoppelter Rezeptoren eine Relaxation von Gefäßmuskelzellen, wobei in diesem Zusammenhang auch CNP eine Rolle spielen könnte. Zu einer Vasodilatation führt außerdem die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) in Endothelzellen (mit anschließender Diffusion zur Gefäßmuskulatur und dortiger Wirkungsentfal-

tung), hervorgerufen durch die ANP-vermittelte Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS). ANP hemmt auch die Synthese und Freisetzung von TNF $\alpha$  in Makrophagen und dämmt damit seine potentiell fördernde Wirkung auf die Entwicklung einer Herzinsuffizienz. Calderone bringt dies in seinem kürzlich veröffentlichten Review<sup>120</sup> mit der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) in Verbindung, die einen Teil dieser krankheitsfordernden Wirkungen von TNF $\alpha$  vermitteln soll.

Ein weiterer Angriffspunkt zur Regulation des Blutdrucks ist die Gefäßpermeabilität. ANP-Infusionen erhöhen diese und bewirken so eine Volumenumverteilung von intravasal nach interstitiell, welche wiederum einen hypotensiven Effekt darstellt.<sup>121</sup>

Im Gefäßsystem provoziert ANP außerdem **antiproliferative** Reaktionen. Sie wurden sowohl in Endothelzellen<sup>122</sup> als auch in den glatten Gefäßmuskelzellen<sup>122-124</sup> nachgewiesen; in der Gefäßmuskulatur unterdrückt es ferner die Produktion extrazellulärer Matrix.

Der Hauptsyntheseort von ANP und BNP, das Herz, exprimiert selbst auch NP-Rezeptoren. In beiden Vorhöfen und im linken Ventrikel wurde mRNA der Rezeptortypen A, B und C gefunden. Auf Kardiomyozyten findet sich vor allem der NPR-A, wogegen auf kardialen Fibroblasten der NPR-C prädominant zu sein scheint.<sup>120</sup> NP-vermittelte Wirkungen am Herzen umfassen die Hemmung der Proliferation kardialer Fibroblasten<sup>125</sup> sowie die Suppression deren Kollagensynthese<sup>126</sup>. Auf Herzmuskelzellen wirkt ANP **antihypertroph**.<sup>60-62</sup> Diese Effekte sprechen für ein umfangreiches protektives Potential der natriuretischen Peptide im Bezug auf die maladaptive Umstrukturierung kardialen Gewebes bei der Ausbildung einer Herzinsuffizienz.

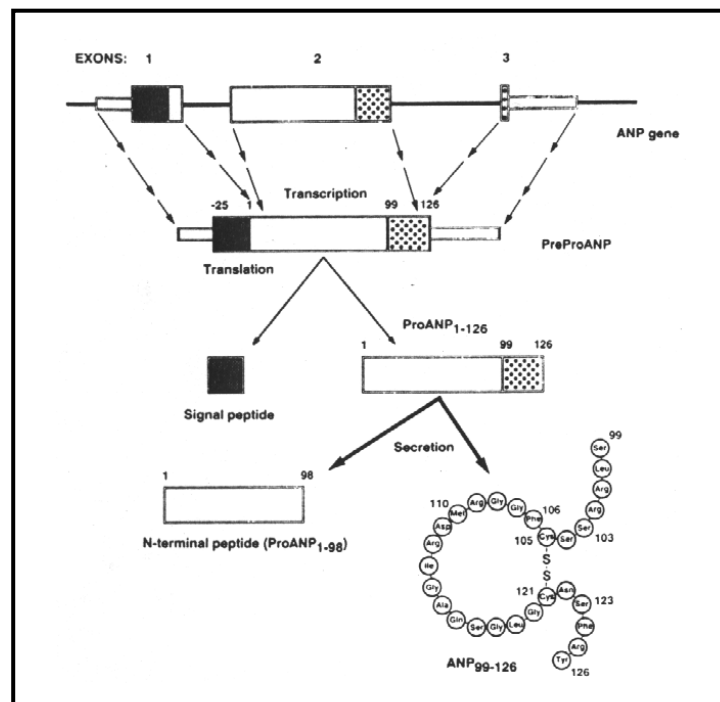
Wieso es trotzdem zu einem Überwiegen schädigender Einflüsse und der Progredienz der Erkrankung kommt ist bisher nicht ausreichend geklärt. Veränderungen an den Rezeptoren können zur Wirkungsabschwächung natriuretischer Peptide im Sinne einer Hormonresistenz führen und wurden (wie unter 1.2.1 beschrieben) detailliert untersucht. Demgegenüber scheint es auch zur Modulation der ANP-Freisetzung bei Herzinsuffizienz zu kommen. Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zum Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen dieser Variation leisten.

## 1.2.3 Kinetik

### 1.2.3.1 Synthese

Das ANP-Gen befindet sich auf Chromosom 1 und kodiert mit 3 Exons das Vorluferprotein PraProANP<sup>134-138</sup> (Abb.2). Durch Abspaltung des sogenannten Signalpeptids wird der Transport

über die Membran des endoplasmatischen Retikulums ermöglicht und es entsteht ProANP, die Hauptspeicherform von ANP in kardialen Myozyten.<sup>139-141</sup> Dies liegt dort in Zellmembranbenachbarten Granula vor und wird in Reaktion auf adäquate Sekretionsreize via Exozytose freigesetzt.<sup>142,143</sup> Im Zuge der Freisetzung erfolgt durch die Serinprotease Corin<sup>144</sup> die Spaltung des 126 Aminosäuren umfassenden ProANP in das C-terminale und biologisch aktive ANP<sub>99-126</sub> und das N-terminale Peptid (ANP<sub>1-98</sub>). In einigen Publikationen wurden auch für das C-terminale Peptid und seine Spaltprodukte spezifische Wirkungen beschrieben.<sup>145-147</sup>



**Abbildung 2:** schematische Darstellung der **ANP-Synthese** (Abbildung aus Ruskoaho 1992<sup>236</sup>)

### 1.2.3.2 Freisetzung

Bei normaler Herzfunktion wird ANP vor allem in den Vorhöfen synthetisiert und freigesetzt.<sup>148</sup> Für die Freisetzung des Hormons sind verschiedene Stimuli nachgewiesen worden. Der am längsten bekannte und äußerst potente Sekretionsreiz ist die **mechanische Dehnung kardialer Myozyten**.<sup>149,150</sup> Sein exakter Transduktionsmechanismus ist nicht bekannt, es sind jedoch eine Vielzahl von Einflussfaktoren beschrieben worden, wie z.B. die zelluläre  $Ca^{2+}$ -Homöostase. So wurde die ANP-Freisetzung durch Dehnung kardialen Gewebes unter der Blockade dehnungsaktivierter Ionenkanäle<sup>151</sup> und Hemmung der  $Ca^{2+}$ -Abgabe aus dem sarkoplasmatischen Retikulum<sup>152-154</sup> vermindert. Auch die Inhibition von  $Ca^{2+}$ -Calmodulin<sup>153,155,156</sup> und der Proteinkinase C<sup>158,159</sup> führte zu einer Abschwächung der dehnungsinduzierten ANP-Sekretion.

ET 1 dagegen steigert die Freisetzung bei Vorhofdehnung<sup>160,161</sup>, wobei dieser Effekt durch die Einwirkung von NO negativ beeinflusst wird<sup>162</sup>. Ang II hat wie ET-1 auch eine verstärkende Wirkung auf die ANP-Sekretion, jedoch geringer ausgeprägt.<sup>163</sup>

Nicht nur die dehnungsinduzierte sondern auch die **basale Freisetzung** von ANP wird durch verschiedenste Plasmafaktoren beeinflusst. Sie wird durch ET-1 via Bindung an den G-Proteingekoppelten ET<sub>A</sub>-Rezeptor erhöht.<sup>164-166</sup> Dieser bringt eine Signalkaskade in Gang, die zu einer intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Mobilisation und Aktivierung der Proteinkinase C führt (siehe 1.1.2). Dass diese intrazellulären Vorgänge in die Vermittlung der ANP-Sekretionssteigerung eingebunden sind, wird dadurch unterstrichen, dass Ca<sup>2+</sup>-Kanal-Antagonisten<sup>167-170</sup> und die Inhibition von Calmodulin<sup>171,172</sup> sowie der Proteinkinase C<sup>171,173</sup> zu einer Herabsetzung der ET-1-induzierten ANP-Freisetzung führen. Auch Noradrenalin bewirkt durch die Bindung an ebenfalls G-Proteingekoppelte  $\alpha$ -Rezeptoren und die konsekutive Aktivierung der Proteinkinase C<sup>157</sup> sowie die zytosolische Erhöhung der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration<sup>157,174</sup> eine Freisetzung von ANP aus Kardiomyozyten. Weiterhin binden ADH<sup>160,175-177</sup> und Ang II<sup>178,179</sup> an GPGRs und haben eine ANP-Sekretionssteigerung zu Folge.

Die PKC-Downstream-Transduktion birgt indes noch viele Rätsel. Bekannt ist eine ANP-Geninduktion durch die Stimulation der MAP-Kinase-Kaskade.<sup>180,181</sup> Die Freisetzung von ANP durch ADH<sup>182</sup>,  $\alpha$ -Rezeptor-Agonist Isoproterenol<sup>183</sup>, PKC-Stimulator PMA<sup>184</sup> sowie durch Ca<sup>2+</sup>-Kanalöffner<sup>177</sup> wird unter der Einwirkung von Cyclooxygenase-Hemmstoffen abgeschwächt, sodass auch Prostaglandine in den Prozess der ANP-Sekretion involviert zu sein scheinen.

Gehemmt wird die ANP-Basalfreisetzung ebenfalls durch NO<sup>185,186</sup> und Adrenomedullin<sup>187</sup>.

Im Zustand der Herzinsuffizienz sind die basalen Plasmaspiegel von biologisch aktivem ANP<sup>63-67</sup> und dem N-terminalen Peptid<sup>188-191</sup> erhöht. In vivo Experimente zeigten bei Vorhofdehnung jedoch eine abgeschwächte ANP-Freisetzung bei Herzinsuffizienz.<sup>205,210,211,237</sup>

Die Plasmaspiegel korrelieren mit dem Schweregrad der Erkrankung<sup>93</sup> und lassen sich aus diesem Grund diagnostisch einsetzen. In diesem Zusammenhang scheint allerdings die Messung von BNP dem ANP als prognostischem Marker bei der Herzinsuffizienz überlegen zu sein.<sup>192</sup>

Wie es zu der Spiegelerhöhung bei Herzinsuffizienz kommt, ist nicht vollständig geklärt. Über eine Induktion am eigentlichen Synthesort, den Herzvorhöfen, bestehen divergente Ansichten.

So liegen widersprüchliche Daten zur ANP-mRNA-Menge in den Vorhöfen insuffizienter Herzen vor.<sup>197,200,214</sup> Auch in Bezug auf die Konzentration synthetisierten ANPs in atrialem Gewebe<sup>194,200,214</sup> und den Gesamthormongehalt der hypertrophierten Vorhöfe<sup>194,214,219</sup> gehen die Angaben auseinander. Das für die vorliegenden Versuche angewendete Shuntmodell an der Ratte er-

gab in früheren Studien normale bis erhöhte mRNA-Mengen<sup>237,240,241</sup> und eine erhöhte oder erniedrigte Konzentration von ANP<sup>237,238</sup> in den Herzvorhöfen. Der atriale Gesamthormongehalt war beim Shunt normal bis erhöht.<sup>237,238</sup>

Wahrscheinlich kommen die erhöhten ANP-Plasmaspiegel bei der Herzinsuffizienz vor allem durch eine vermehrte Freisetzung aus den Herzkammern zustande. Diesbezüglich wurden beim aortokavalen Shunt an der Ratte<sup>237,240,241</sup> und an anderen Tiermodellen der Herzinsuffizienz<sup>193,197,214</sup> sowie bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie<sup>196,199,200</sup> erhöhte Mengen an ANP-mRNA in den Herzkammern nachgewiesen. Die ventrikuläre ANP-Expression wird in Verbindung mit der Reinduktion fetaler Genprogramme<sup>28,198</sup> im Zuge der Entwicklung kardialer Insuffizienz gesehen. Auch von vermehrtem Vorliegen synthetisierten Hormons im Ventrikelgewebe liegen zahlreiche Nachweise an unterschiedlichen experimentellen Insuffizienzmodellen<sup>193,194</sup> (u.a. beim aortokavalen Shunt an der Ratte<sup>237,238</sup>) sowie bei humaner Herzinsuffizienz<sup>200,217,218</sup> vor. Ungeklärt bleibt jedoch vorerst, wodurch die vermehrte ANP-Synthese und -Freisetzung hervorgerufen wird. Bei der Herzinsuffizienz ist eine erhebliche Anzahl an Faktoren aktiviert (Noradrenalin<sup>49,50</sup>, ET-1<sup>51-53</sup>, Ang II<sup>54</sup>, ADH<sup>55</sup>, NO<sup>68</sup>, Adrenomedullin<sup>69-71</sup>, Prostaglandine<sup>73</sup>), die in oben beschriebener Weise die Freisetzung von ANP beeinflussen können. Zusätzlich ist es nicht auszuschließen, dass sich ihr Wirkmechanismus bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz verändert. So wurde beispielsweise für AngII ein förderlicher Effekt auf die ANP-Freisetzung aus atrialem Gewebe der Ratte festgestellt.<sup>178,179</sup> Verschiedene Studien an Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie<sup>211</sup> bzw. an Tiermodellen der Herzinsuffizienz<sup>212,237</sup> deuten allerdings darauf hin, dass eine Wirkungsminderung von Ang II (via ACE-Hemmer bzw. ATII-Rezeptor-Blockade) bei der Herzinsuffizienz die ANP-Plasmaspiegel anheben kann. Da Ang II ebenso wie mehrere andere bei Herzinsuffizienz aktivierte Plasmafaktoren die Aktivität der Proteinkinase C beeinflusst, ist es von Interesse die Rolle der PKC bei der Regulation der ANP-Freisetzung näher zu erforschen. Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Versuche sollen zur Klärung dieser Problematik einen Beitrag leisten.

### 1.2.3.3 Abbau

Nach der Freisetzung aus den Kardiomyozyten, verweilt ANP durchschnittlich nur 4,5 Minuten im Plasma.<sup>201</sup> Es wird vor allem durch die Bindung an den NP-Rezeptor C und enzymatische Degradation via neutrale Endopeptidase 24.11 abgebaut.<sup>202</sup>

### **1.3 Fragestellungen**

Im Vorangegangenen wurde die Entstehung der Herzinsuffizienz basierend auf der neurohormonalen Hypothese beschrieben. In diesem Kontext fokussiert die vorliegende Arbeit auf das kardioprotektiv wirkende atriale natriuretische Peptid. Es liegt bei der Herzinsuffizienz in erhöhtem Maße im Plasma vor<sup>63-67</sup> und wurde mit Blick auf seine kardiale Freisetzung in vitro untersucht. Zwei Aspekte standen diesbezüglich im Vordergrund: die stimulierte ANP-Freisetzung durch Vorhofdehnung und die basale ANP-Freisetzung unter Ruhebedingungen.

Folgenden Fragestellungen wurden dazu bearbeitet:

1. Wie ist die basale ANP-Freisetzung bei Herzinsuffizienz in vitro verändert?
2. Weicht die dehnungsinduzierte ANP-Sekretion bei der Herzinsuffizienz auch in vitro vom Zustand normaler Herzfunktion ab?
3. Welche Funktion hat die Proteinkinase C bei der Regulation der ANP-Freisetzung bei der Herzinsuffizienz?
4. Stehen die ANP-Plasmakonzentration und hämodynamische Parameter wie die Koronarperfusion in Zusammenhang mit der Freisetzung von ANP?

Zu diesem Zweck wurde die ANP-Freisetzung an einem Modell der Herzinsuffizienz (aortokavaler Shunt an der Ratte) unter Ruhebedingungen, bei Vorhofdehnung sowie unter Stimulation der Proteinkinase C untersucht und mit gesunden Kontrollgruppen verglichen.

## **2. MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1 Tierhaltung**

Für die Versuche sind ausschließlich männliche Wistar-Ratten (Moellegaard-Tierfarm, Schönwalde) verwendet worden. Sie wurden in einem 12-h-Tag-Nacht-Rhythmus gehalten, erhielten handelsübliches Futter und hatten freien Zugang zum Trinkwasser.

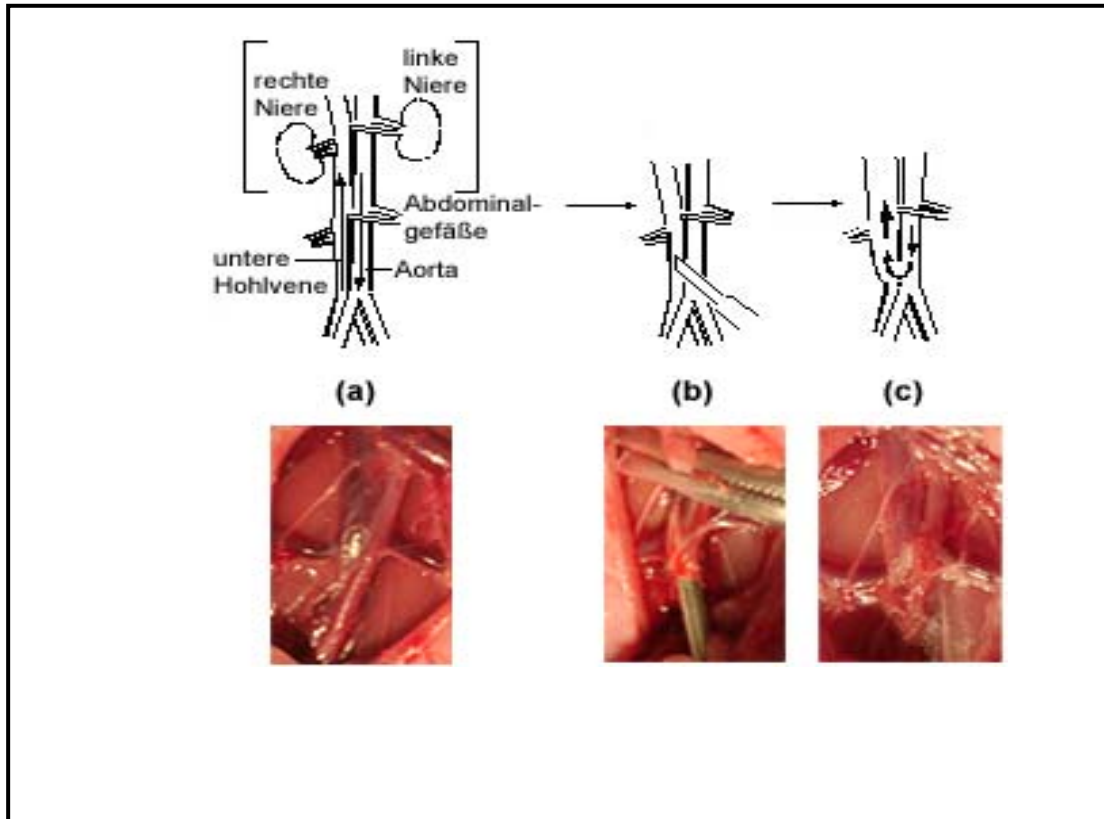
### **2.2 Aortokavaler Shunt**

Die Methode wurde erstmalig von Garcia und Diebold 1990<sup>203</sup> angewendet und mit modifizierter Technik wie folgt durchgeführt:

Bei 240–260g schweren Ratten wurde unter Äthernarkose (Diethyläther, Hedinger Chemikalien, Stuttgart) nach Rasur des Fells und Desinfektion der Bauchhaut die Abdominalhöhle eröffnet sowie die Vena cava inferior und Aorta abdominalis stumpf präpariert (Abb. 3a). Es folgte ein kurzzeitiges Abklemmen der Aorta unterhalb der Abgänge der Aa. renales zwecks Unterbrechung des arteriellen Blutflusses. Ein mit leichtem Druck auf den distalen Abschnitt der V. cava inferior aufgesetzter Tupfer verhinderte den venösen Rückstrom in das Operationsareal. In diesem Areal ließ sich dann die V. cava inferior mit einer Strauß-Kanüle (1,8mm; Braun, Melsungen) rechtsseitig punktieren und nach weiterem Vorschieben mit Perforation der aneinandergrenzenden Wände von Aorta und Vena cava eine Verbindung zwischen diesen beiden Gefäßen schaffen (Abb. 3b.). Die Kanüle wurde anschließend zügig zurückgezogen, die Einstichstelle mit Zyanoacrylatkleber (Instant Crazy Glue, Bordon Company, Willowdale, Ontario, Kanada) verschlossen und die Blutzirkulation wieder hergestellt.

Bei Gelingen der Shuntoperation war kranial der geschaffenen Fistel ein deutliches Anschwellen der unteren Hohlvene mit Annehmen der helleren Rotfarbe arteriovenösen Mischblutes zu beobachten (Abb. 3c). Abschließend wurde die abdominale Muskelschicht und die Haut via Knopfnahntechnik verschlossen.

Die Kontrolltiere erfuhren bis auf die Gefäßpunktion eine identische Behandlung.



**Abbildung 3:** Durchführung der Shunt-Operation.

## 2.3 Organentnahme

Vier Wochen nach Shunt-OP wurde unter Anästhesie mit Chloralhydrat (Merck, Darmstadt) der Thorax eröffnet, das schlagende Herz mit Gefäßstiel entnommen und in eiskalter KREBS-Lösung (Zusammensetzung siehe 2.4.2. Technische Umsetzung) von eventuell mitentfernten Gewebsresten befreit.

Nach Darstellung des ca. 3 mm langen Aortenstumpfes wurde das Herz umgehend an das Langendorff-Perfusionssystem angeschlossen und für den darauffolgenden Versuch präpariert.

## **2.4 Arbeit am isoliert schlagenden Herzen**

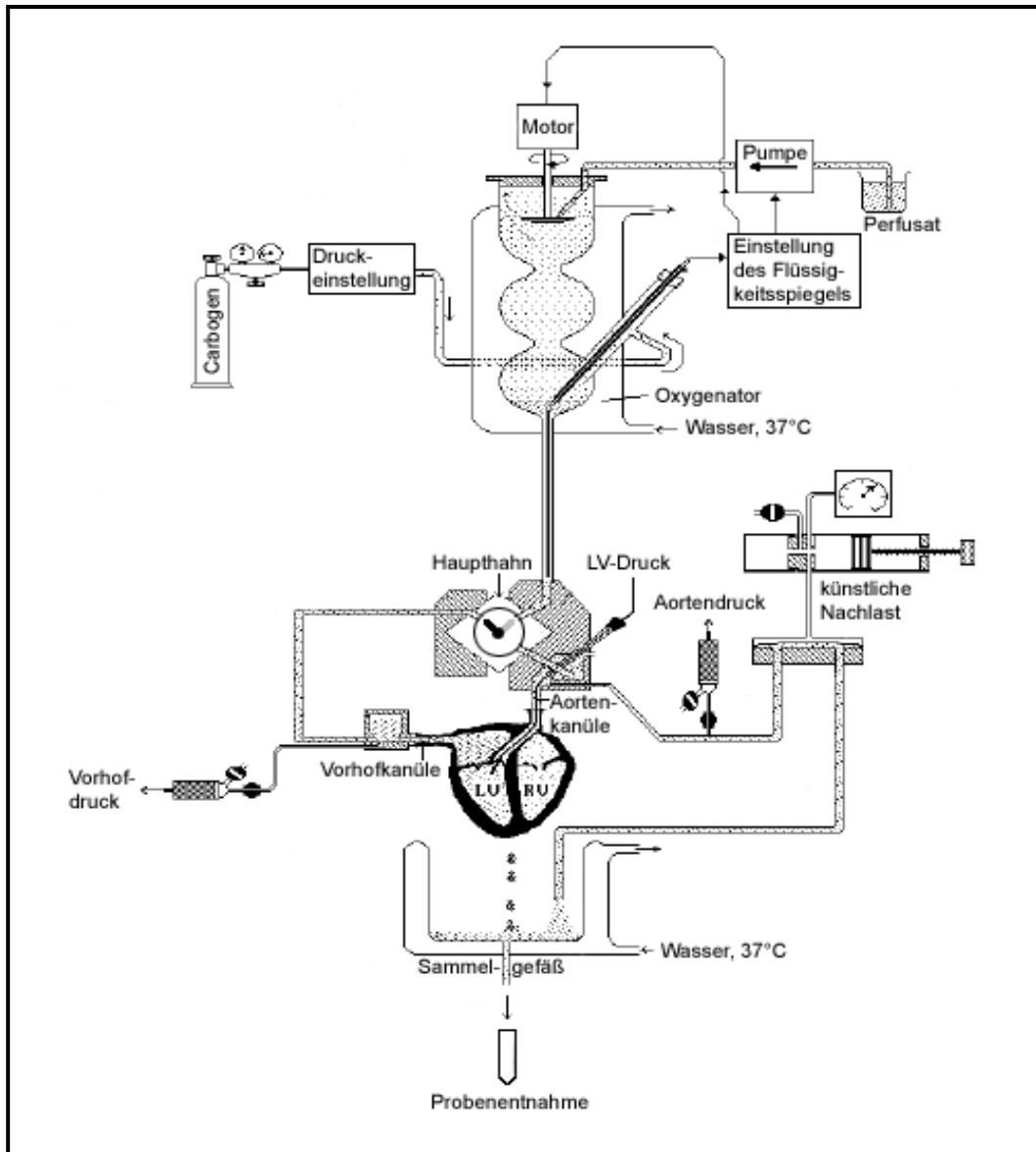
### **2.4.1 Perfusionsprinzip**

Mit der verwendeten Apparatur (Isoliertes Herz Typ 830 Gr.3, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten) war es möglich, das in vitro spontan schlagende Herz mit Hilfe zweier unterschiedlicher Perfusionsmodi zu untersuchen.

Zunächst wurde das Herz mit dem Aortenstumpf frei hängend an der Aortenkanüle (Abb. 4) angebracht. Die über die Aortenkanüle zugeführte, blutersetzende Perfusionslösung strömte mit einem Druck von 65 mmHg retrograd (entgegengesetzt der physiologischen Flussrichtung) in die Aorta und gelangte bei intakter Aortenklappe nicht in den linken Ventrikel, sondern floss über die Koronararterien und den Sinus coronarius in den rechten Vorhof. Von dort aus lief es zu einem Teil durch die Hohlvenenstümpfe und zum anderen Teil durch die Trikuspidalklappe, den rechten Ventrikel und schließlich den verbliebenen proximalen Teil der A. pulmonalis ab und konnte über eine Öffnung im unteren Bereich des Sammelgefäßes aufgefangen werden.

Dieser retrograde Perfusionsmodus wird im Folgenden als Langendorff-Modus (LD) bezeichnet. Durch Umstellen des Haupthahns war es binnen weniger Sekunden möglich, zum antegrad verlaufenden Perfusionsmodus zu wechseln. Bei diesem sogenannten Working-Heart-Modus (WH) wurde das Perfusat mit einem Druck von 10 mmHg über eine abflussdicht im linken Atrium platzierte Kanüle zugeführt. Dies hatte zum einen den Effekt der Vorhofdehnung, zum anderen förderte das spontan schlagende Herz die Perfusionslösung aktiv in den linken Ventrikel und gegen einen einstellbaren Widerstand von in diesem Fall 50 mmHg (Simulation der Nachlast) in die Aorta. Das linke Herz leistete somit Druck-Volumen-Arbeit. Das in die Aorta gepumpte Perfusat floss anschließend in die Koronararterien und nahm im weiteren den oben beschriebenen Verlauf. Überschritt das Herzminutenvolumen den koronaren Fluss, so strömte das zusätzliche Volumen über den Nachlastschlauch direkt in das Sammelgefäß und konnte zusammen mit dem übrigen Perfusat für weitere Messungen aufgefangen werden.

Um ein Entweichen von Flüssigkeit aus dem linken Vorhof zu verhindern, sind die Venae pulmonales vor Versuchsbeginn mit Perma-Hand Seide (3-0, Ethicon, Norderstedt) ligiert worden.



**Abbildung 4: Versuchsaufbau** zur Arbeit mit isolierten Herzen. In der rechten Position des Hauptfahns wurde das Herz im Langendorff-Modus retrograd perfundiert. Durch Umschalten nach links in den Working-Heart-Modus wechselte die Flussrichtung des Perfusats nach antegrad. (Abbildung zum Teil aus der Bedienungsanleitung zur Apparatur isoliertes Herz Größe 3, Typ 830; Version 1.0<sup>243</sup>)

## 2.4.2 Technische Umsetzung

Als Perfusat wurde eine Variation der KREBS-HENSELEIT-Lösung mit folgender Zusammensetzung in mmol/l verwendet: NaCl 118; KCl; 4,70; CaCl<sub>2</sub> 1,50; MgSO<sub>4</sub> 2,10; NaHCO<sub>3</sub> 24,7; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,23; Glukose 11,1; EDTA 0,06. Eine Schlauchpumpe beförderte die Lösung in den temperierbaren (37°C) Oxygenator, an dessen zur Oberflächenvergrößerung kugelig ausgebuchteter Innenwand sie als dünner Flüssigkeitsfilm entlang lief und durch das eingeleitete Carbogen

(5 Vol.% CO<sub>2</sub>, 95 Vol.% O<sub>2</sub>, Fa. Linde) oxygeniert und auf einen pH-Wert von 7,4 gebracht wurde.

Ein manuell in den linken Ventrikel eingeführter Mikro-Tip-Katheter-Druckaufnehmer (Millar Instruments, Houston) und zwei dünne Schlauchkatheter im Aortenwindkessel/Blasenfang und Vorhofkanüliersystem mit angeschlossenem Druckwandler (P23XL, Statham) und Verstärker (TA 11, Gould Electronics, Dietzenbach) ermöglichten die Messung der Druckbedingungen in der Aorta, dem linkem Vorhof und dem linken Ventrikel.

### 2.4.3 Versuchsdurchführung

Um die ANP-Freisetzung am Herzen zuvor shuntoperierter Tiere vergleichend mit der an Kontrolltierherzen zu untersuchen, wurden zwei Versuchsreihen (A & B) durchgeführt. Vor Beginn jedes einzelnen Experiments erfolgte, nach Einbringen des zu untersuchenden Herzens in das Perfusionssystem und dessen Präparation unter Perfusion im Langendorff-Modus (LD), eine 30minütige Äquilibrationsphase, in der keine Manipulationen stattfanden.

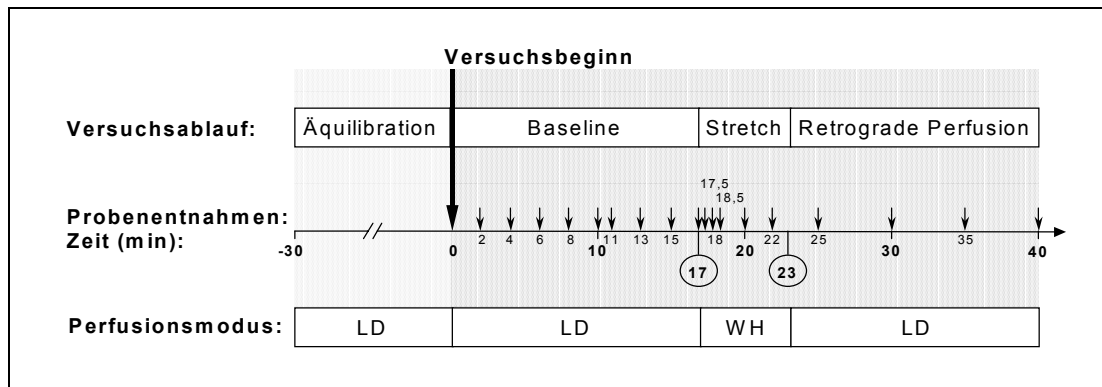
Zu **Versuch A**: Es wurde auf eine etwaige Abweichung der ANP-Freisetzung auf den adäquaten Reiz (Vorhofdehnung) bei Herzinsuffizienz untersucht. Dazu wurde die dehnungsinduzierte ANP-Sekretion vergleichend zwischen Kontrolle (n=13) und Shunt (n=14) analysiert. Im Anschluss an die Äquilibrationsphase umfasste dieser Versuch einen Zeitraum von 40 Minuten und bestand aus drei zeitlich aufeinanderfolgenden Abschnitten (Abb. 5):

**(1) Baseline** (0.-17.min): Unter Perfusion im LD-Modus wurden zu den Zeitpunkten 0. • 2. • 4. • 6. • 8. • 10. • 11. • 13. • 15. Minute über je 60s Perfusat aufgefangen und gewogen. Anschließend wurden davon ca. 1-2ml umfassende Proben entnommen und sofort eiskalt gekühlt.

**(2) Stretch** (17.-23.min): Mit Beginn der 17. Minute wurde auf den WH-Modus umgestellt. Dadurch kam es in oben beschriebener Weise zu einer Dehnung der Wand des linken Atriums. Die Probenentnahme erfolgte nach dem Schema: 17. • 17,5. • 18. • 18,5. • 20. • 22. Minute. Die Entnahmezeiträume 17, 17,5 und 18 betragen dabei je 30s, die folgenden jeweils 60s. Wieder wurde das aufgefangene Perfusat gewogen (wenn nötig auf 60s normiert) und die entnommenen Proben sofort in Eis gekühlt.

**(3) retrograde Perfusion** (23.-40.min): Die Rückstellung auf den LD-Modus fand zu Beginn der 23. Versuchsminute statt. Während der 25., 30., 35. und 40. Minute wurde die Perfusionslö-

sung über jeweils 60s aufgefangen und anschließend wie in den Schritten eins und zwei verfahren.



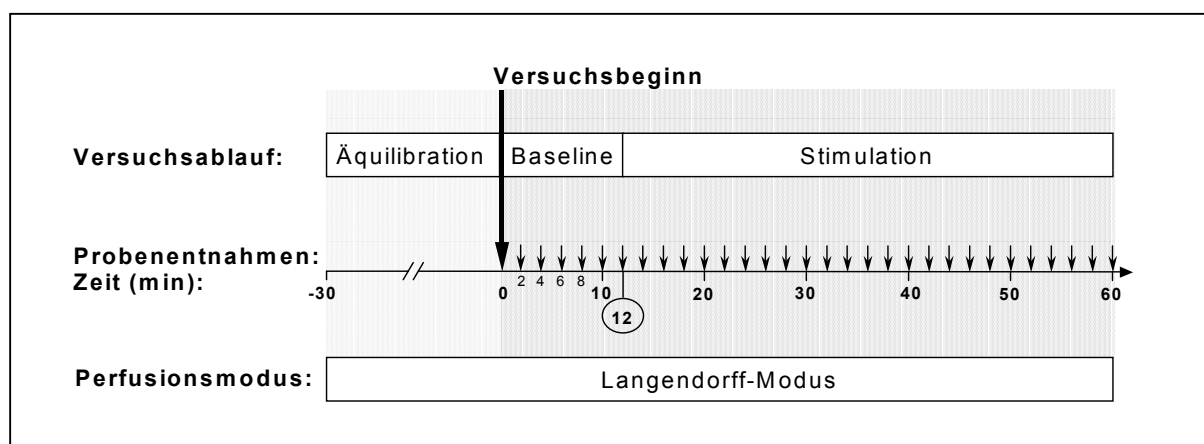
**Abbildung 5: Versuchsablauf A;** LD = (retrograder) Langendorff-Modus; WH = (antegrader) Working-Heart-Modus.

Die eisgekühlten Proben wurden nach Versuchsende umgehend bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren und bis zur Bestimmung der enthaltenen ANP-Konzentration mittels Radioimmunoassays gelagert.

Zu **Versuch B:** Hierbei wurde die ANP-Sekretion unter Einwirkung eines Proteinkinase-C-Aktivators (Phorbol-12-Myristat-13-Azetat, PMA) im retrograden LD-Perfusionsmodus untersucht.

In einer Zeit von 60 min wurde das Perfusat kontinuierlich aufgefangen und das entsprechende Gefäß zur Probenentnahme und Registrierung des Perfusionsvolumens alle 2 min gewechselt. Die ca. 1-2ml umfassenden Proben wurden sofort eiskalt gekühlt und nach Beendigung des Experiments bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die ersten 12 min des Versuchs verliefen ohne Zugabe von PKC-stimulierenden Substanzen. Ab Beginn der 13. Minute bis Ende des Experiments wurde dann mit PMA – enthaltendem Perfusat (50nM) oder mit Vehikel stimuliert (Abb. 6).



**Abbildung 6: Ablauf des Versuchs B;** Langendorff-Modus entspricht retrograder Perfusion.

Diese Versuchsreihe wurde mit insgesamt 25 entnommenen Herzen durchgeführt, wobei die Zuteilung zu den verschiedenen Versuchsgruppen in Tabelle 1 zu sehen ist.

Stimulation mit →	Vehikel	50 nM PMA
Kontrolle	5	5
Shunt	8	7

**Tabelle 1:** Tieranzahl in den Versuchsgruppen.

## 2.5 Bestimmung der diskutierten Parameter

### 2.5.1 Koronarperfusion

Um das Flüssigkeitsvolumen zu bestimmen, welches das zu untersuchende Herz in oben beschriebener Weise (2.4.1 Perfusionsprinzip) pro Minute passierte, wurde das Perfusat durch eine Öffnung im unteren Bereich der temperierten Herzkammer über einen Zeitraum von 0,5-2 Minuten aufgefangen und anschließend gewogen. Das gemessene Gewicht in Gramm ergab das geförderte Volumen in Milliliter und wurde durch die Anzahl der Minuten, in denen die Flüssigkeit gesammelt wurde, geteilt und ergab so das Perfusionsvolumen ( $V_{\text{Perfusion}}$ ) in ml/min.

### 2.5.2 ANP-Konzentration

Die ANP-Konzentration in den Perfusatproben wurde mittels eines spezifischen Radioimmunoassays (RIA) unter der Verwendung eines ANP-Antikörpers (J. Gutkowska, Montreal, Kanada) von einer Mitarbeiterin des Labors bestimmt.

### 2.5.3 ANP-Sekretion

Anhand des Perfusionsvolumens ( $V_{\text{Perfusion}}$ ) und der gemessenen ANP-Konzentration im Perfusat ( $c_{\text{ANP}}$ ) konnte die im Verlauf von einer Minute in die Perfusionsflüssigkeit sezernierte ANP-Menge ( $n_{\text{ANP}}$ ) berechnet werden.

$$n_{\text{ANP}} \text{ (fmol / min)} = c_{\text{ANP}} \text{ (fmol / ml)} * V_{\text{Perfusion}} \text{ (ml / min)}$$

## **2.6 Statistische Auswertung**

Bei den variablen Parametern (ANP-Freisetzung, ANP-Konzentration und Koronarperfusion) wurde zunächst die Fläche unter der Kurve berechnet, die durch die jeweiligen Werte des Parameters (Y-Achse) über den Zeitverlauf einer bestimmten Versuchsphase (X-Achse) entsteht.

Die Daten der Versuchsgruppen wurden mit dem Statistikprogramm SPSS®11.0 für Windows 2000 auf Normalverteilung getestet. Da diese nicht vorlag, wurden die Ergebnisse nichtparametrisch getestet. Bei zwei unabhängigen Stichproben wurde der Mann-Whitney-U-Test, bei mehreren unabhängigen Stichproben der Kruskal-Wallis-Test verwendet, um auf signifikante Unterschiede in den Versuchsgruppen zu prüfen. Abhängige Stichproben wurden mittels Wilcoxon-Test auf Signifikanz geprüft. Zur Analyse longitudinaler Daten kam die parameterfreie Varianzanalyse nach Brunner zum Einsatz (SAS®V8.2). Die Signifikanzgrenze wurde mit  $p < 0,05$  festgelegt.

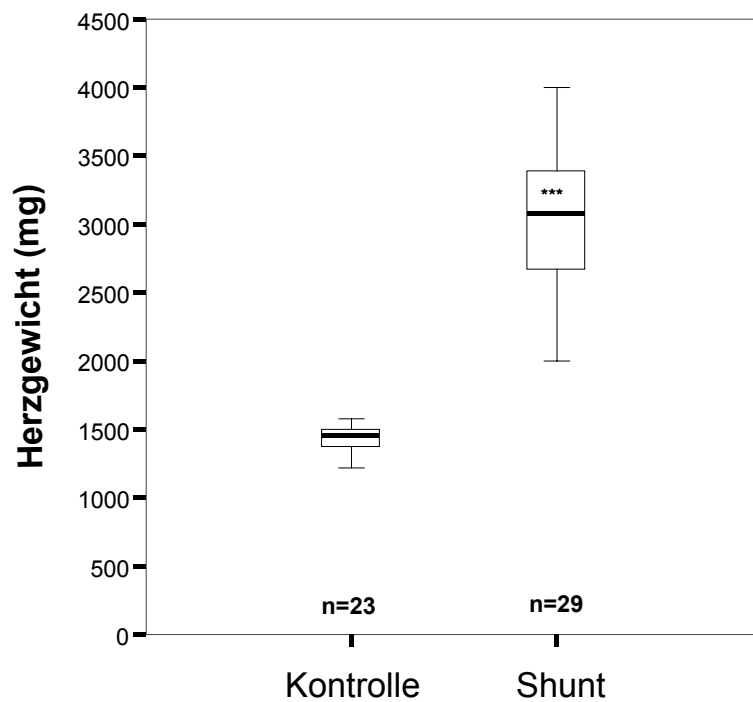
Alle gruppenspezifischen Werte wurden in Form des Medians der betreffenden Versuchsgruppe angegeben. Zur Darlegung der Streuung der Werte, wurde der zugehörige Interquartilsbereich (75-25) in eckigen Klammern hinter dem Median aufgeführt.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 Daten zum Shuntmodell

##### 3.1.1 Herzgewicht

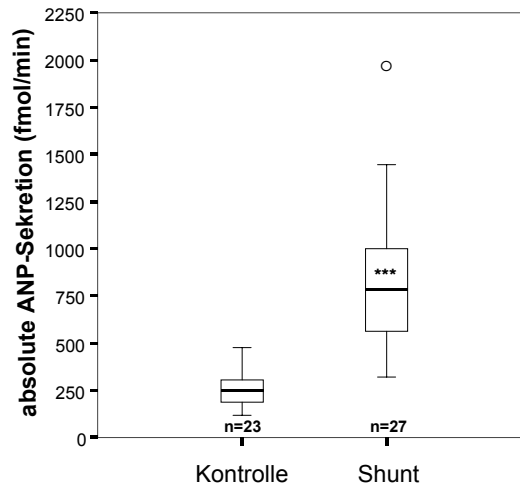
Dreißig Tage nach Operation der Versuchstiere waren die Herzen der Tiere in der Shuntgruppe (3090g [865]) im Median deutlich schwerer als die der Kontrolltiergruppe (1460g [120]);  $p < 0,001$ ; Abb. 7).



**Abbildung 7: Herzgewicht** bei Kontrolltieren und Tieren mit Shunt nach 30 Tagen; \*\*\* $p < 0,001$  Shunt vs. Kontrolle.

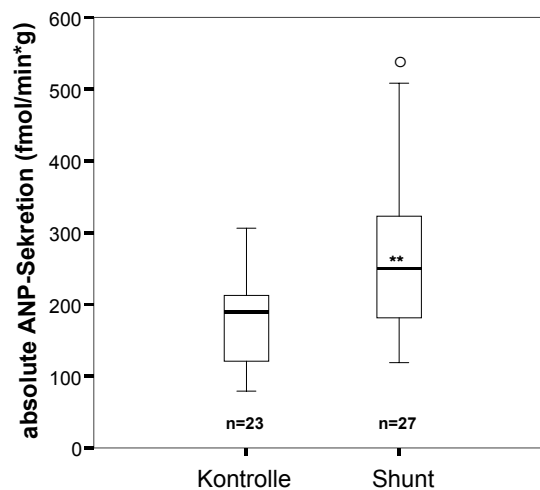
### 3.1.2 ANP – Sekretion

Die ANP-Freisetzung innerhalb des Zeitraumes von einer Minute war in der Shuntgruppe unter Baselinebedingungen deutlich höher als in der Kontrollgruppe (Kontrolle: 253,9 fmol/min [133,7] vs. Shunt: 780,3 fmol/min [478,4];  $p < 0,001$ ; Abb.8).



**Abbildung 8: ANP-Sekretion** unter Baselinebedingungen; \*\*\* $p < 0,001$  Kontrolle vs. Shunt. (o entspricht Ausreißer)

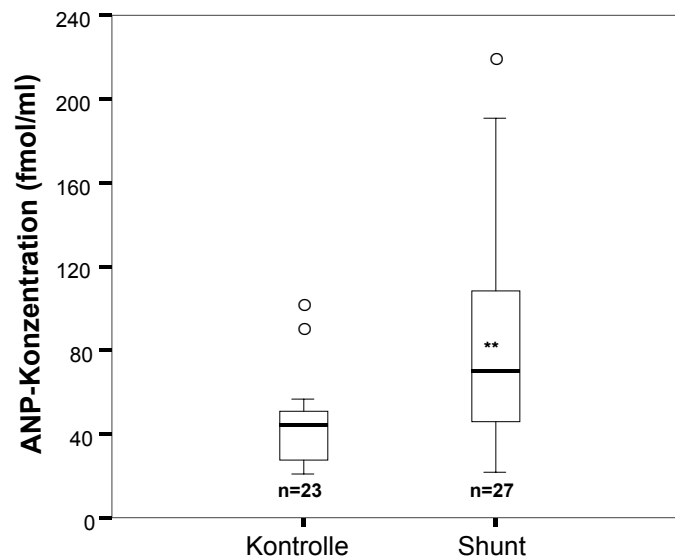
Auch pro Gramm Herzgewicht setzten die Herzen von Shunttieren signifikant mehr ANP frei als die Herzen der Kontrollgruppe (Kontrolle: 189,2 fmol/min\*g [96,6] vs. Shunt: 250,1 fmol/min\*g [168,0];  $p < 0,01$ ); Abb.9).



**Abbildung 9: ANP-Freisetzung je Gramm Herzgewicht** unter Baselinebedingungen; \*\* $p < 0,01$  (o entspricht Ausreißer).

### 3.1.3 ANP – Konzentration

Die Konzentration von ANP in der perfundierenden Flüssigkeit war bei den Herzen der shuntoperierten Tiere unter Baselinebedingungen signifikant höher als in der Kontrollgruppe (Shunt: 69,4 fmol/ml [71,8] vs. Kontrolle: 43,5 fmol/ml [25,6]  $p < 0,01$ ; Abb. 10).

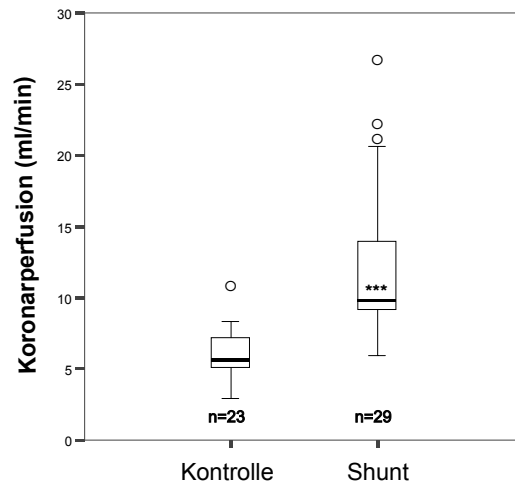


**Abbildung 10:** basale ANP-Konzentration in der Perfusionsflüssigkeit bei Herzen von Kontroll- bzw. Shunttieren; \*\* $p < 0,01$  Shunt vs. Kontrolle. (○ entspricht Ausreißer)

Zwischen den Versuchen A und B kam es dabei zu Abweichungen, wobei im Perfusat der Shuntgruppe des zweiten Versuchs höhere ANP-Konzentrationen vorlagen als bei der Shuntgruppe des ersten Versuchs.

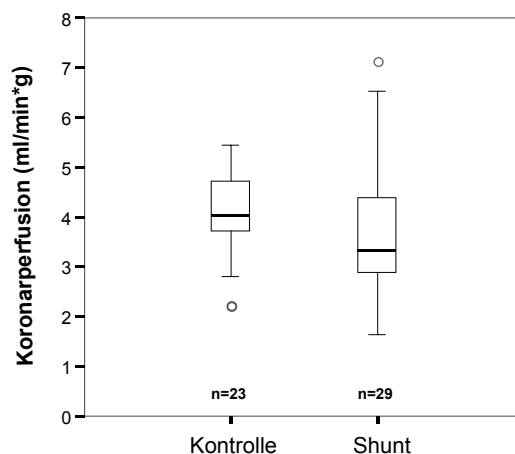
### 3.1.4 Koronarperfusion

Die koronare Perfusion der Herzen von Shunttieren war unter Baselinebedingungen im Median höher als die der Kontrolltiere (Kontrolle: 5,6 ml/min [2,3] vs. Shunt: 9,8 ml/min [5,9];  $p < 0,001$ ; Abb.11).



**Abbildung 11: Koronarperfusion** der Herzen aus der Kontroll- bzw. der Shuntgruppe unter Baselinebedingungen;  $***p < 0,001$  Shunt vs. Kontrolle. (○ entspricht Ausreißer)

Bezogen auf das Herzgewicht in Gramm fanden sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Shuntgruppe (Kontrolle: 4,0ml/min\*g [1,1] vs. Shunt: 3,3ml/min\*g [1,8]  $p = 0,16$ ; Abb. 12).

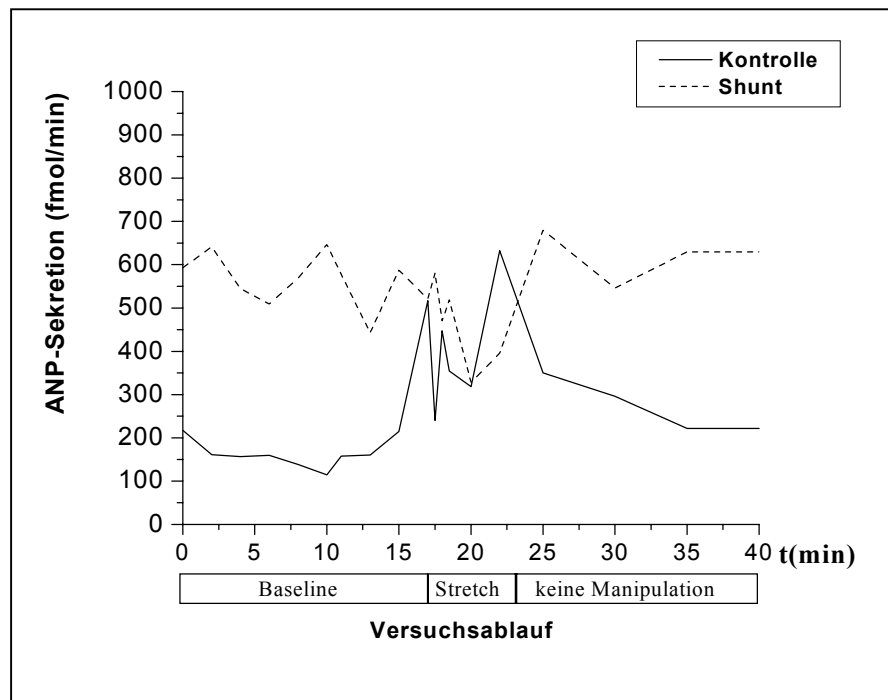


**Abbildung 12: Koronarperfusion je Gramm Herzgewicht** in der Kontroll- und der Shuntgruppe unter Baselinebedingungen;  $p = 0,16$  Shunt vs. Kontrolle (○ entspricht Ausreißer).

## 3.2 Versuch A: Analyse der dehnungsinduzierten ANP-Freisetzung

### 3.2.1 ANP-Sekretion

Es zeigten sich Unterschiede zwischen der ANP-Sekretion der Herzen von Shunt- bzw. Kontrolltieren (Abb. 13).

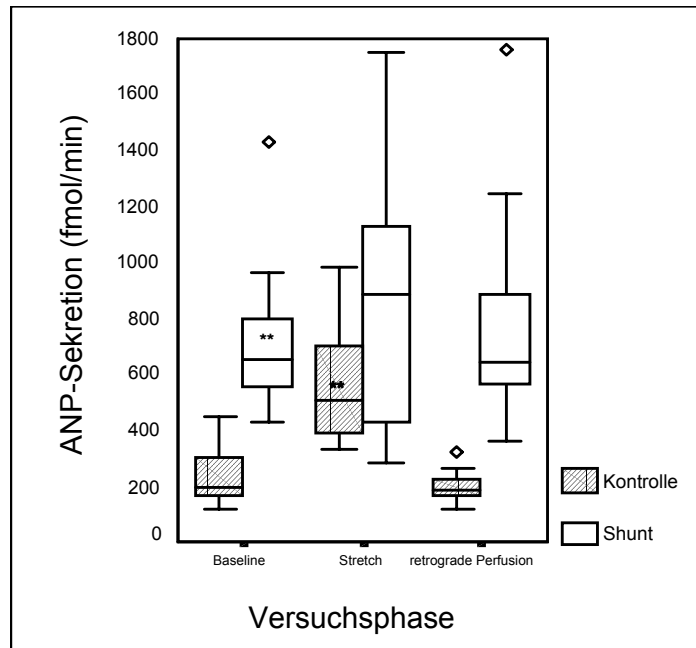


**Abbildung 13: ANP – Sekretion;** exemplarischer Einzelfallverlauf des Versuchs mit den Herzen von jeweils einem Shunt- und einem Kontrolltier.

Die Herzen der Kontrolltiere zeigten einen starken Anstieg der ANP-Sekretion bei Vorhofdehnung (Stretch: 509,2 fmol/min [332,9] vs. Baseline: 205,0 fmol/min [174,2];  $p < 0,01$ ; Abb. 14). In der Shuntgruppe dagegen fand sich keine signifikante Veränderung der ANP-Ausschüttung durch Vorhofdehnung (Stretch: 885,6 fmol/min [700,9] vs. Baseline: 654,8 fmol/min [269,3];  $p = 0,25$ ). Die ANP-Freisetzung unter Vorhofdehnung war demnach bei Herzen von shuntoperierten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe abgeschwächt.

Die absolute ANP-Sekretion der Herzen von Shunttieren unterschied sich in der Phase der Vorhofdehnung nicht von der Kontrollgruppe ( $p = 0,06$  Kontrolle vs. Shunt).

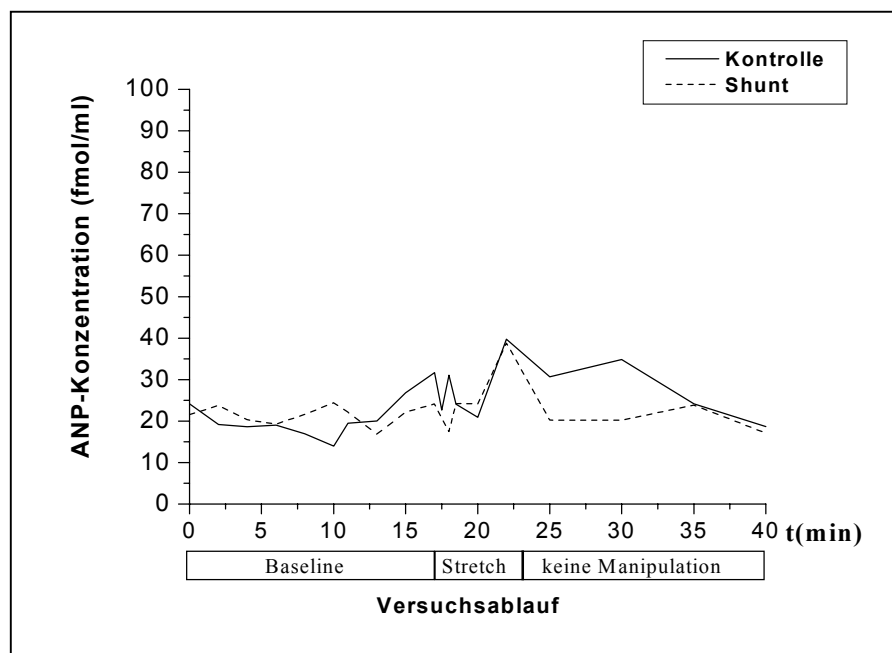
In der dritten Versuchsphase (retrograde Perfusion) wurde ANP in beiden Versuchsgruppen wieder auf dem jeweiligen Baselinenniveau freigesetzt (Kontrolle: 187,3 fmol/min [89,1],  $p = 0,35$  vs. Baseline; Shunt: 646,0 fmol/min [362,9];  $p = 0,42$  vs. Baseline).



**Abbildung 14: ANP – Sekretion** im Vergleich von Shunt und Kontrolle während der Versuchsphasen: Baseline, Stretch und retrograde Perfusion. \*\* $p < 0,01$  vs. Baseline der Kontrollgruppe. (◇ entspricht Ausreißer)

### 3.2.2 ANP – Konzentration

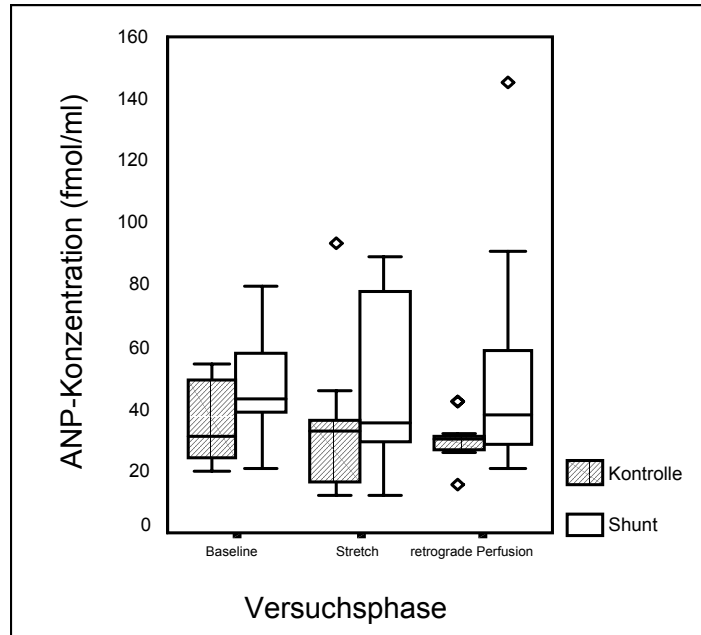
Die Konzentration von ANP in der perfundierenden Flüssigkeit änderte sich während des Versuchs nicht signifikant (Abb. 15).



**Abbildung 15: ANP-Konzentration** im Perfusat; exemplarischer Einzelfallverlauf des Versuchs mit den Herzen jeweils eines Shunt- und eines Kontrolltiers.

Die ANP-Konzentration in der Flüssigkeit, welche die Herzen der Shuntgruppe perfundierte unterschied sich in keiner Versuchsphase von der Kontrollgruppe (Baseline:  $p=0,30$  Shunt vs. Kontrolle; Stretch:  $p=0,40$  Shunt vs. Kontrolle; retrograde Perfusion:  $p=0,37$  Shunt vs. Kontrolle; Abb. 16).

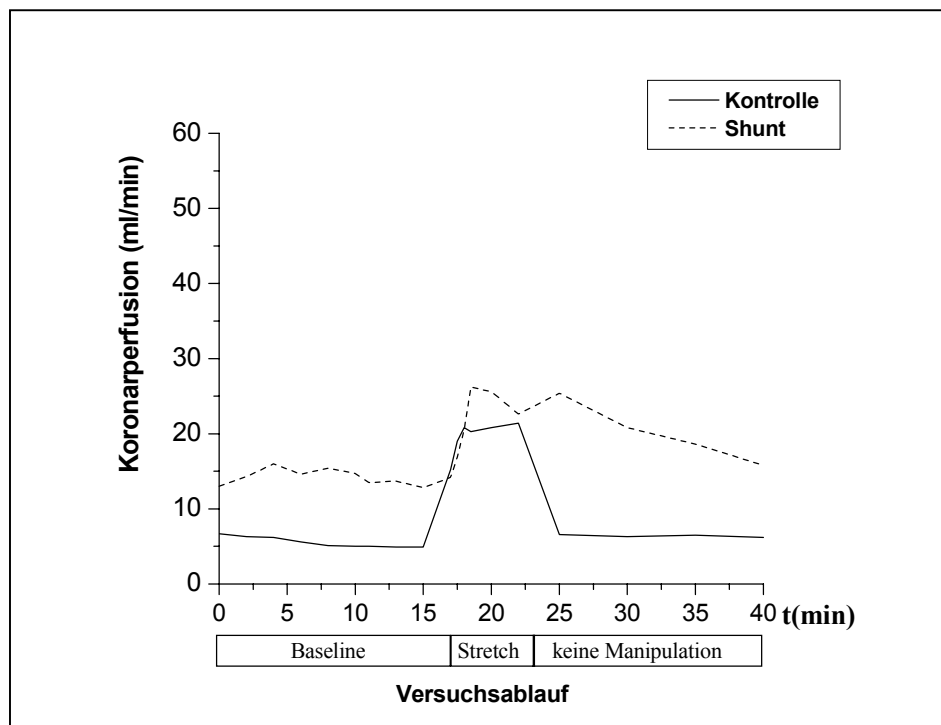
Auch fanden sich keine Unterschiede der ANP-Konzentration zwischen den verschiedenen Versuchsphasen. So bewirkte die Vorhofdehnung in keiner Versuchsgruppe eine Änderung der ANP-Konzentration im Perfusat (Kontrolle: Stretch 32,6 fmol/ml [24,7] vs. Baseline 42,1 fmol/ml [26,2],  $p=0,35$ ; Shunt: Stretch 35,7 fmol/ml [50,6] vs. Baseline 44,4 fmol/ml [28,0],  $p=1,00$ ). Ebenso unterschied sich die ANP-Konzentration in beiden Gruppen während der dritten Versuchsphase (retrograde Perfusion) nicht von den vorhergehenden Versuchsphasen (Kontrolle: 30,6 fmol/ml [15,4],  $p=0,08$  vs. Baseline,  $p=0,92$  vs. Stretch; Shunt: 42,6 fmol/ml [43,1];  $p=0,45$  vs. Baseline;  $p=0,48$  vs. Stretch).



**Abbildung 16: ANP-Konzentration** im Perfusat im Vergleich von Kontrolle und Shunt während der Versuchsphasen: Baseline, Stretch und retrograde Perfusion. ( $\diamond$  entspricht Ausreißer)

### 3.2.3 Koronarperfusion

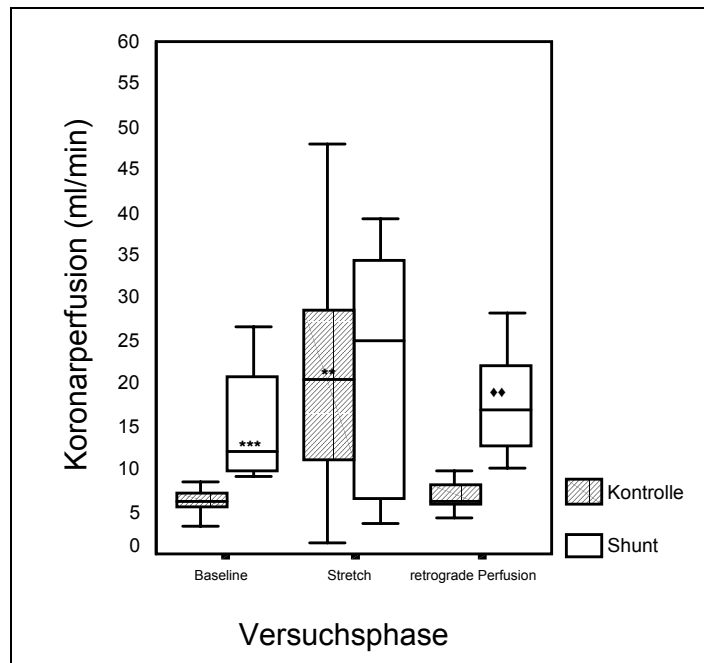
Die Änderung des koronaren Perfusionsvolumens über den Zeitverlauf von 40 Minuten wies Unterschiede zwischen der Kontroll- und der Shuntgruppe auf (Abb. 17).



**Abbildung 17: Koronarperfusion;** exemplarischer Einzelfallverlauf des Versuchs mit den Herzen jeweils eines Shunt- und eines Kontrolltiers.

Die Herzen von Shunttieren wurden unter Baselinebedingungen von einer größeren Flüssigkeitsmenge perfundiert als die Herzen von Kontrolltieren (Shunt: 12,5 ml/min [11,0] vs. Kontrolle: 6,1 ml/min [2,0],  $p < 0,001$ ; Abb. 18). Durch Umschalten auf den Working-Heart-Modus und damit Dehnung des linken Vorhofs (Versuchsphase: „Stretch“) stieg die Koronarperfusion in der Kontrollgruppe stark an (Stretch: 20,5 ml/min [19,6] vs. Baseline: 6,1 ml/min [2,0];  $p < 0,01$ ). Die Perfusion der Herzen von Shunttieren dagegen steigerte sich im Working-Heart-Modus nicht im Vergleich zur Baseline (Stretch: 24,9 ml/min [30,2] vs. Baseline: 12,5 ml/min [11];  $p = 0,22$ ). Die Koronarperfusion beider Versuchsgruppen erreichte damit im Working-Heart-Modus ein gleich hohes Niveau (Kontrolle: 20,5 ml/min [19,6] vs. Shunt: 24,9 ml/min [30,2];  $p = 0,92$ ).

Nach dem Wechsel zur retrograden Perfusion (3. Versuchsphase) sank das Perfusionsvolumen in der Kontrollgruppe wieder auf Baseliniveau (6,2 ml/min [3,0];  $p = 0,97$  vs. Baseline). In der Shuntgruppe war es geringfügig größer als während der Baseline (16,5 ml/min [9,7];  $p < 0,01$  vs. Baseline; Abb.18).



**Abbildung 18: Koronarperfusion** bei Shunt- und Kontrollherzen während der Versuchsphasen: Baseline, Stretch und retrograde Perfusion. \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$  vs. Baseline der Kontrollgruppe; ♦♦ $p < 0,01$  vs. Baseline der Shuntgruppe.

### 3.3 Versuch B: Stimulation der Proteinkinase C

#### 3.3.1 ANP - Sekretion

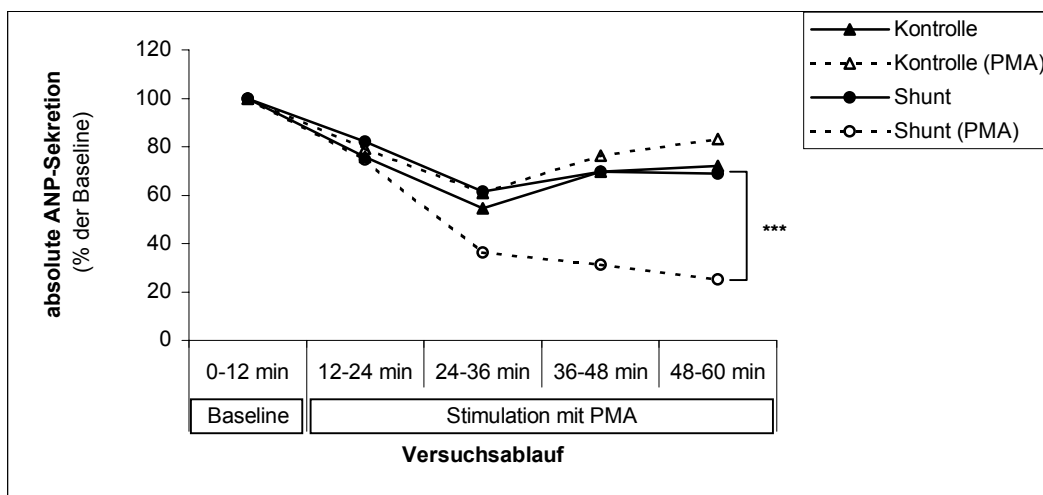
Ohne Beeinflussung der Proteinkinase C war die ANP-Sekretion der Herzen von Kontrolltieren zu Beginn des Versuchs übereinstimmend mit der Sekretion am Ende des Versuchs ( $p = 0,08$  Baseline vs. Vehikel; Tabelle 2).

Versuchsgruppe	Stimulation mit:	Baseline	nach Stimulation (48-60min)
		Median [IB] in fmol/min	Median [IB] in fmol/min
Kontrolle	Vehikel	255,7 [138,5]	181,2 [77,9]
Kontrolle	PMA	256,4 [168,2]	196,0 [137,1]
Shunt	Vehikel	811,5 [715,2]	534,6 [423,7]*
Shunt	PMA	863,3 [651,4]	264,8 [197,0]*

**Tabelle 2: ANP-Sekretion** unter Baselinebedingungen sowie nach Stimulation mit PMA bzw. Vehikel; \* $p < 0,05$  Baseline vs. Stimulation (48-60min); [IB]= Interquartilsbereich (75-25).

Auch die Stimulation der Proteinkinase C mit PMA bewirkte in der Kontrollgruppe keinen Unterschied der ANP-Freisetzung im Vergleich zur Baseline ( $p = 0,35$  Baseline vs. PMA).

Bei der Shuntgruppe fiel die ANP-Freisetzung sowohl unter Gabe von Vehikel als auch unter der Stimulation der PKC mit PMA ab ( $p < 0,05$  Baseline vs. Vehikel/PMA; Tabelle 2). Durch Betrachtung der prozentualen Veränderung der ANP-Sekretion zur Baseline über den Zeitverlauf von 60 Minuten (Brunner-Varianzanalyse) ergaben sich keine Unterschiede zwischen den Vehikel-stimulierten Versuchsgruppen ( $p = 0,49$  Kontrolle vs. Shunt; Abb. 19). Die Kontrollherzen wurden in ihrer ANP-Sekretion durch die Stimulation der Proteinkinase C nicht beeinflusst ( $p = 0,74$  PMA vs. Vehikel). In der Shuntgruppe dagegen bewirkte die PMA-Zugabe einen deutlichen Abfall der ANP-Freisetzung ( $p < 0,001$  PMA vs. Vehikel).



**Abbildung 19: ANP-Freisetzung** unter Stimulation der Proteinkinase C mit PMA. \*\*\* $p < 0,001$  Shunt (PMA) vs. Shunt (Vehikel).

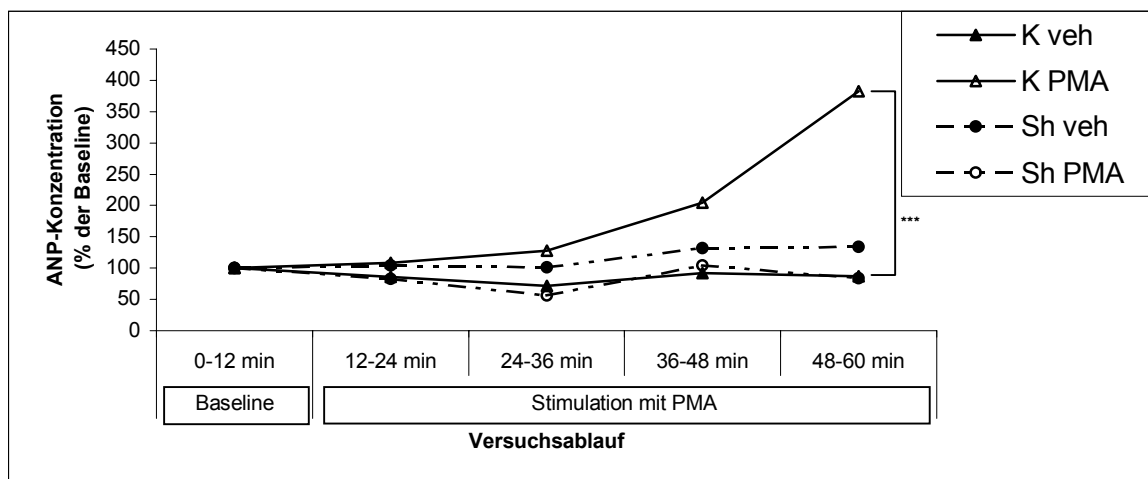
### 3.3.2 ANP – Konzentration

Die Konzentration von ANP im Perfusat blieb ohne Stimulation der PKC sowohl in der Shunt- als auch in der Kontrollgruppe konstant (Kontrolle:  $p=0,50$  Vehikel vs. Baseline; Shunt:  $p=0,06$  Vehikel vs. Baseline; Tabelle 3). Bei den Herzen von Kontrolltieren kam es durch PKC-Stimulation mit PMA zu einem starken Anstieg der ANP-Konzentration in der Perfusionsflüssigkeit ( $p<0,05$  PMA vs. Baseline). Im Gegensatz dazu zeigte sich im Versuch mit Herzen von Shunttieren keine Veränderung der ANP-Konzentration im Perfusat durch die Einwirkung von PMA ( $p=0,98$  PMA vs. Baseline; Tabelle 3).

Versuchsgruppe	Stimulation mit:	Baseline	nach Stimulation (48-60min)
		Median [IB] in fmol/ml	Median [IB] in fmol/ml
Kontrolle	Vehikel	30,5 [47,8]	35,7 [29,0]
Kontrolle	PMA	47,5 [33,0]	184,8 [98,3]*
Shunt	Vehikel	101,3 [76,9]	137,4 [72,0]
Shunt	PMA	87,4 [50,8]	72,1 [129,3]

**Tabelle 3: ANP-Konzentration** unter Baselinebedingungen und nach Stimulation der Proteinkinase C mit PMA bzw. Vehikel. [IB]= Interquartilsbereich (75-25).

Die prozentuale Änderung der ANP-Konzentration zur Baseline wies im Verlauf von 60 Minuten einen signifikanten Unterschied zwischen Vehikel- und PMA-stimulierter Kontrollgruppe auf ( $p<0,001$  Kontrolle (PMA) vs. Kontrolle (Vehikel); Abb.20).



**Abbildung 20: ANP – Konzentration im Perfusat** unter Stimulation der Proteinkinase C mit PMA. \*\*\* $p<0,001$  Kontrolle (PMA) vs. Kontrolle (Vehikel).

Zwischen den anderen Versuchsgruppen bestanden keine Unterschiede in der relativen Konzentrationsänderung über den Zeitverlauf von 60 Minuten.

### 3.3.3 Koronarperfusion

Bei allen Versuchgruppen sank das koronare Perfusionsvolumen über den Zeitverlauf von 60 Minuten ab (Tabelle 4).

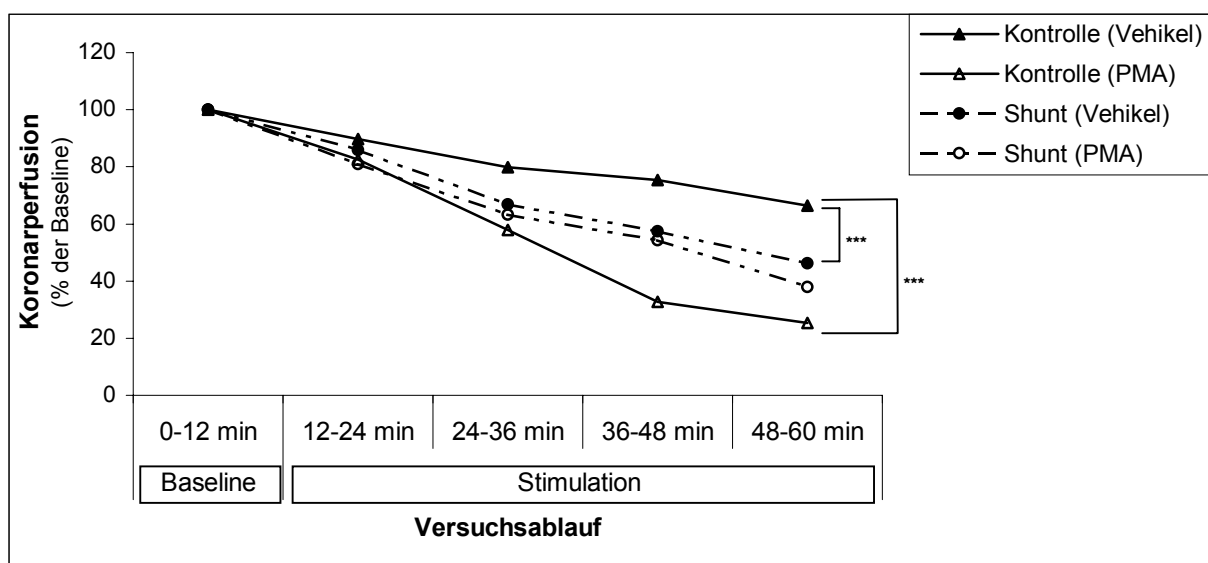
Versuchsgruppe	Stimulation mit:	Baseline	nach Stimulation (48-60min)
		Median [IB] in ml/min	Median [IB] in ml/min
<b>Kontrolle</b>	Vehikel	5,7 [5,3]	4,3 [3,4] *
<b>Kontrolle</b>	<b>PMA</b>	5,1 [1,9]	1,3 [0,6] *
<b>Shunt</b>	Vehikel	7,7 [3,5]	3,7 [1,6] *
<b>Shunt</b>	<b>PMA</b>	9,8 [6,6]	2,6 [4,9] *

**Tabelle 4: Koronarperfusion** unter Baselinebedingungen und nach Stimulation der PKC mit PMA bzw. Vehikel. [IB] = Interquartilsbereich (75-25); \*  $p < 0,05$  vs. Baseline

Die koronare Perfusion der Herzen von Shunttieren nahm unter Vehikelgabe prozentual stärker ab als dies in der Kontrollgruppe (Vehikel) der Fall war ( $p < 0,001$  Kontrolle (Vehikel) vs. Shunt (Vehikel); Abb. 21).

Die PKC-Stimulation mit PMA bewirkte in der Shuntgruppe allerdings keinen weiteren Abfall der Koronarperfusion ( $p = 0,85$  Vehikel vs. PMA).

Dahingegen hatte die Stimulation der Proteinkinase C bei Herzen von Kontrolltieren einen signifikanten Einfluss. Hier fiel der Koronarfluss unter Einwirkung von PMA stark ab ( $p < 0,001$  Kontrolle (Vehikel) vs. Kontrolle (PMA)).



**Abbildung 21: Koronarperfusion** unter Stimulation der Proteinkinase C durch PMA.

\*\*\*  $p < 0,001$  Kontrolle (Vehikel) vs. Shunt (Vehikel) bzw. Kontrolle (Vehikel) vs. Kontrolle (PMA).

## 4. DISKUSSION

### 4.1 Daten zum Shuntmodell

Als Modell der Herzinsuffizienz durch chronische Volumenbelastung wurde der aortokavale Shunt bei der Ratte gewählt. Das Herz wurde zur Durchführung der Experimente entnommen und isoliert schlagend untersucht, wobei die Perfusion unter konstanten Druckbedingungen aufrecht erhalten wurde. Zur Diskussion der Versuche wurden dabei folgende Parameter herangezogen:

- *Herzgewicht* (als Hypertrophiemarker im Zuge kardialen Remodelings),
- *ANP-Freisetzung* des Herzens pro Zeiteinheit (Fokus dieser Arbeit, der mit den übrigen Parametern in Beziehung gesetzt werden soll),
- *ANP-Konzentration* in der perfundierenden Flüssigkeit (als Modell der ANP Plasmaspiegel im lebenden Organismus) sowie die
- *Koronarperfusion* (zur Beurteilung von Weit- oder Engstellung der Herzkranzgefäße).

Im Folgenden wurden die variablen Werte wie ANP-Freisetzung, ANP-Konzentration im Perfusat sowie die Koronarperfusion der isoliert schlagenden Herzen unter Ruhebedingungen aufgezeichnet (das heißt bei retrograder Perfusion während der Baseline der durchgeführten Versuche) und zwischen Shunt- und Kontrollgruppe verglichen. Auf diesem Wege sollen die Veränderungen im Ruhezustand bei Herzinsuffizienz am Modell herausgearbeitet werden. Darauf basierend werden im Anschluss die Veränderungen der Parameter bei Vorhofdehnung im Versuch A sowie bei Stimulation der Proteinkinase C im Versuch B, diskutiert.

#### 4.1.1 Herzgewicht

Das Herzgewicht zuvor shuntoperierter Tiere war mehr als doppelt so groß wie das der Kontrolltiere. Eine gravierende Zunahme des Herzgewichts wurde bei Patienten mit Herzinsuffizienz von A. Linzbach schon 1960<sup>216</sup> beschrieben. Für diesen Prozess scheinen vor allem myozytäre Hypertrophie und ein robustes Wachstum interstitieller Matrix verantwortlich zu sein, aber auch von kardiomyozytärer Hyperplasie wurde durch einige Autoren berichtet (in Übersicht abgehandelt durch Francis 2001<sup>3</sup>).

Durch die Shunt-Operation wurde eine Verbindung zwischen abdomineller Aorta und Vena cava inferior geschaffen. Dadurch floss ein Teil des Herzminutenvolumens unter Umgehung der Kreislaufperipherie direkt zurück in den venösen Schenkel und zum Herzen, wodurch es zu einer verstärkten kardialen Volumenbelastung kam. Es ist anzunehmen, dass die dadurch zunehmende diastolische Wandspannung durch Bildung neuer hintereinander liegender Sarkomere<sup>8,10-13</sup> eine exzentrische Hypertrophie hervorrief, widergespiegelt in der deutlichen Gewichtszunahme der Herzen in der Shuntgruppe.

In der Literatur und auch durch unsere Arbeitsgruppe wurden zahlreiche Abweichungen der Hämodynamik shuntoperierter Ratten beschrieben. So kam es zu einer Erhöhung des zentralen Venendrucks bzw. rechtsatrialen Drucks<sup>237-239</sup> und des linksventrikulären enddiastolischen Drucks<sup>238,240</sup> sowie zu einer Abnahme des arteriellen Drucks<sup>238-240</sup>. Diese Abweichungen sind typisch für das Vorliegen einer Herzinsuffizienz.<sup>1</sup> Eine starke Zunahme des Herzgewichts durch Shuntinduktion wurde auch von anderen Autoren beschrieben.<sup>237-241</sup>

Zusammenfassend kann der aortokavale Shunt an der Ratte als etabliertes und valides Modell der volumeninduzierten Herzinsuffizienz gewertet werden. Das in den hier dargestellten Versuchsreihen ermittelte Herzgewicht entsprach dem anderer Versuchsserien in unserer Arbeitsgruppe, in denen eine detaillierte hämodynamische Charakterisierung durchgeführt wurde.<sup>237,240</sup> Um durch Manipulation mit kardialen Kathetern nicht auf die ANP-Freisetzung einzuwirken, wurde in den vorliegenden Versuchen auf eine erneute hämodynamische Messung verzichtet und die Zunahme des Herzgewichts in der Shuntgruppe als Ausdruck kardialer Insuffizienz interpretiert.

#### **4.1.2 ANP – Freisetzung**

Die ANP-Menge, die unter Baselinebedingungen pro Minute von den Herzen shuntoperierter Tiere sezerniert wurde, überstieg das Dreifache der Freisetzung in der Kontrollgruppe. Auch je Gramm Herzgewicht war die ANP-Freisetzung der Herzen von Shunttieren signifikant höher als in der Kontrollgruppe.

Die beobachtete Steigerung der ANP-Basalfreisetzung könnte die deutlich erhöhten ANP-Plasmaspiegel bei Patienten mit kardialer Insuffizienz<sup>63-67</sup> erklären. Am Shuntmodell<sup>237-239</sup> sowie an diversen anderen Modellen der Herzinsuffizienz<sup>193,194,214</sup> konnte bisher einheitlich eine Erhöhung der ANP-Spiegel im Plasma in vivo gezeigt werden. Das Fortbestehen der veränderten ANP-Freisetzung in vitro spricht hierbei für eine andauernde Störung, die auch in Abwesenheit

von hämodynamischer Überbelastung und ohne den Einfluss von zirkulierenden Hormonen weiterbesteht.

In der Literatur besteht weitgehende Einigkeit darüber, dass die Induktion der ANP-Synthese in den Herzkammern eine wesentliche Rolle bei der Steigerung der ANP-Freisetzung bei Herzinsuffizienz spielt. Diesbezüglich wurden beim aortokavalen Shunt an der Ratte<sup>237,240,241</sup> und an anderen Tiermodellen der Herzinsuffizienz<sup>193,197,214</sup> sowie bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie<sup>196,199,200</sup> erhöhte Mengen an ANP-mRNA in den Herzkammern nachgewiesen. Die ventrikuläre ANP-Expression wird in Verbindung mit der Reinduktion fetaler Genprogramme<sup>28,198</sup> im Zuge der Entwicklung kardialer Insuffizienz gesehen. Auch von vermehrtem Vorliegen synthetisierten Hormons im Ventrikelgewebe liegen zahlreiche Nachweise an unterschiedlichen experimentellen Insuffizienzmodellen<sup>193,194</sup> (u.a. beim aortokavalen Shunt an der Ratte<sup>237,238</sup>) sowie bei humaner Herzinsuffizienz<sup>200,217,218</sup> vor. In Anbetracht dieser Daten ist im vorliegenden Versuch eine wesentliche Beteiligung der Herzkammern an der vermehrten Basalfreisetzung von ANP aus den Herzen von Shunttieren sehr wahrscheinlich.

Mit der Anreicherung von ANP-Molekülen im ventrikulären Herzgewebe kann ANP über Rezeptoren auf den Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten auto- und parakrine Wirkungen entfalten, welche einem maladaptiven kardialen Remodeling entgegenwirken.<sup>60-62,125,126</sup> Da trotz der protektiven Eigenschaften des Hormons eine extreme Gewichtszunahme der Herzen von Shunttieren (als Zeichen kardialer Hypertrophie und Fibrosierung im Zuge maladaptiven Remodelings) zu beobachten war, scheinen prohypertrophe Einflüsse auch im vorliegenden Insuffizienzmodell zu überwiegen.

Ob das vermehrt freigesetzte ANP der Herzen shuntoperierter Tiere auch aus den Vorhöfen stammt, ist auf dem derzeitigen Stand der Forschung nicht eindeutig zu beantworten.

Die Datenlage zur ANP-Synthese in den Vorhöfen präsentiert sich als widersprüchlich. Beim aortokavalen Shunt an der Ratte fanden sich normale bis erhöhte mRNA-Werte.<sup>237,240,241</sup> Das Infarktmodell an der Ratte zeigte eine gesteigerte ANP-Expression.<sup>214,215</sup> Bei kardiomyopathischen Hamstern reichten die Ergebnisse in Bezug auf die ANP mRNA jedoch von erhöhten<sup>219</sup> über unveränderte<sup>221</sup> bis zu signifikant erniedrigten Werten<sup>197</sup>. Eine Studie an Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie<sup>200</sup> zeigte eine Verdopplung der atrialen ANPmRNA bei erkrankten Individuen. Die Konzentration von synthetisiertem ANP in den Herzvorhöfen war bis auf wenige Ausnahmen<sup>200,237</sup> in den meisten Studien zur Herzinsuffizienz erniedrigt.<sup>194,214,238</sup>

Da es jedoch auch in den Vorhöfen zu einer hypertrophen Gewebeerneuerung bei Herzinsuffizienz kommt, wichen die Ergebnisse zum ANP-Gehalt der gesamten Vorhöfe in manchen Fällen von denen zur Konzentration, die sich auf das Gewicht bezieht, ab. Am Shuntmodell zeigten sich

dadurch normale bis erhöhte ANP-Mengen in den Vorhöfen.<sup>237,238</sup> Studien an kardiomyopathischen Hamstern zeigten dagegen widersprüchliche Ergebnisse.<sup>194,195,219</sup>

Der Anteil der Vorhöfe an der Basalfreisetzung bei Herzinsuffizienz ist folglich aufgrund widersprüchlicher Ergebnisse zahlreicher Studien bislang nicht zu eruieren und geht aus der aktuell bestimmten ANP-Sekretion des gesamten Herzen nicht hervor. Mit Blick auf die dargelegte Datenlage stammt das in der Shuntgruppe des aktuellen Versuchs vermehrt freigesetzte ANP mit großer Wahrscheinlichkeit im Wesentlichen aus den Herzkammern.

Wodurch die Induktion und Mehrfreisetzung von ANP aus den Herzkammern hervorgerufen wird, ist bislang nicht geklärt. Bei Herzinsuffizienz aktivierte neuroendokrine Faktoren wie Angiotensin II<sup>178,179</sup>, Endothelin 1<sup>164-166</sup>, Noradrenalin<sup>157,174</sup> und ADH<sup>160,175-177</sup> steigern die ANP-Freisetzung und könnten bei der Zunahme der ANP-Basalfreisetzung durch Shuntinduktion eine Rolle gespielt haben. Eine aktuelle Studie von Tran et al.<sup>213</sup> zeigt eine gesteigerte Expression des ProANP-spaltenden Enzyms Corin im linken Ventrikel am Infarktmodell der Ratte sowie in hypertrophen Kardiomyozytenkulturen. Diese Ergebnisse deuten auf eine regulative Komponente der verstärkten ANP-Freisetzung aus den Ventrikeln bei der Herzinsuffizienz hin.

Der im aktuellen Versuch beobachtete massive Freisetzungsanstieg von ANP in der Shuntgruppe ist ein ausdrücklicher Hinweis darauf, dass der Zustand der Herzinsuffizienz nicht mit einer Insuffizienz der basalen ANP-Freisetzung verbunden ist. Vielmehr scheint hier eine periphere Resistenz der Rezeptor-tragenden Organe vorzuliegen, die im Fall der Niere schon wenige Jahre nach der Entdeckung von ANP nachgewiesen wurde<sup>207,208</sup>. Auf Rezeptorebene kommen mehrere Mechanismen für eine derartige Wirkungsabschwächung in Frage, darunter hormonelle Rezeptordesensitivierung<sup>209</sup> und -downregulation<sup>104</sup> sowie die chloridabhängige Modulation der Rezeptoraffinität gegenüber ANP<sup>105</sup>. Sie wurden unter 1.2.1 näher beschrieben.

### **4.1.3 ANP – Konzentration**

Bei den Herzen der shuntoperierten Tiere war die Konzentration von ANP in der perfundierenden Flüssigkeit unter Baselinebedingungen höher als in der Kontrollgruppe. Setzt man modellhaft die ANP-Konzentration im Perfusat der ANP-Plasmakonzentration im lebenden Organismus gleich, entspricht diese Konstellation den in diversen Studien<sup>63-67</sup> als erhöht erwiesenen ANP-Plasmaspiegeln bei Herzinsuffizienz. Da Unterschiede zwischen den durchgeführten Versuchen bestanden, und das Blut am isoliert schlagenden Modellherz nicht zirkuliert sondern stetig neues/hormon-, enzym- und rezeptorfrees Perfusat zugeleitet wird, soll in der folgenden Diskussion

der Versuchsergebnisse weniger auf die Basalkonzentration selbst als vielmehr auf deren Änderungstendenz nach Manipulation eingegangen werden.

#### **4.1.4 Koronarperfusion**

Die pro Zeiteinheit durch die Koronararterien fließende Flüssigkeitsmenge war bei den Herzen von Shunttieren signifikant erhöht. Da maschinell bedingt konstante Druckverhältnisse vorlagen, muss also der Gesamtquerschnitt der das Herz versorgenden Blutgefäße unter Ruhebedingungen größer gewesen sein, als das in der Kontrollgruppe der Fall war. Dieser Umstand kann prinzipiell durch zwei Mechanismen hervorgerufen werden: die Vergrößerung der Gefäßlumina (Dilatation) und die Bildung neuer Gefäße (Angiogenese).

Eine Koronardilatation erscheint in diesem Zusammenhang unwahrscheinlich. Bei der Herzinsuffizienz wird sogar eine Vasokonstriktion diskutiert.<sup>41</sup> Durch bisherige Studien<sup>42-44</sup> zur koronaren Ruhedurchblutung bei Herzinsuffizienz konnten jedoch keine einheitlichen Ergebnisse erzielt werden, sodass ein Beweis dieser pathologischen Vorgänge bislang ausblieb. Von einer Dilatation der Koronargefäße in der Shuntgruppe kann in Anbetracht der Datenlage allerdings nicht ausgegangen werden.

Folglich ließe sich die Zunahme des koronaren Perfusionsvolumens durch Shuntanlage eher mit einer Induktion der Angiogenese erklären. Tomanek und Torry<sup>206</sup> konnten bei volumeninduzierter kardialer Hypertrophie eine verstärkte Angiogenese nachweisen. Somit kommt die Neubildung von Blutgefäßen in den Herzen von Shunttieren zur Begründung der erhöhten Koronarperfusion im Ruhezustand in Frage.

Je Gramm Herzgewicht zeigten sich zwischen Kontroll- und Shuntgruppe keine Unterschiede in der Koronarperfusion. Man kann dementsprechend einen bedeutenden Einfluss der Koronarperfusion auf die ANP-Sekretion unter Baselinebedingungen ausschließen und davon ausgehen, dass die unterschiedliche basale ANP-Sekretion der beiden Versuchsgruppen durch andere Vorgänge ausgelöst wurde.

## **4.2 Versuch A: Analyse der dehnungsinduzierten ANP-Freisetzung**

Der adäquate Reiz für volumeninduzierte ANP-Freisetzung ist die atriale Dehnung (Stretch).<sup>149,150</sup> Ziel des vorliegenden Versuches war es, ein etwaiges Abweichen dieser Reizantwort bei Herzinsuffizienz (die zumindest in ihren schwereren Stadien in aller Regel mit einer Volumenüberlastung einhergeht) zu erörtern. Zu diesem Zweck wurde über den linken Herzvorhof unter definiertem Druck Perfusionsflüssigkeit zugeleitet, was konsekutiv eine Dehnung der linksatrialen Wand hervorrief.

### **4.2.1 ANP – Freisetzung**

In der Kontrollgruppe bewirkte die Dehnung der Vorhofwand erwartungsgemäß einen starken Anstieg der ANP-Freisetzung auf mehr als das doppelte des Ruhezustandes. Die insuffizienten Herzen shunt-operierter Tiere zeigten unter linksatrialem Stretch hingegen nur eine nicht signifikante Tendenz zur Mehrfreisetzung. Im Gegensatz zur Basalfreisetzung ist die akute ANP-Sekretion der Herzen von Shunttieren in Reaktion auf den adäquaten Dehnungsreiz *in vitro* somit drastisch abgeschwächt.

*In vivo* war die ANP-Freisetzungsantwort insuffizienter Herzen bei atrialer Dehnung in mehreren Versuchsreihen abgeschwächt. Die Dehnung der Vorhofwand wurde unter anderem durch akute intravasale Volumenexpansion hervorgerufen und führte beim Shunt-Modell an der Ratte<sup>237</sup> sowie bei der Schrittmacher-induzierten Herzinsuffizienz bei Hunden<sup>205</sup> zu einer signifikant geringeren ANP-Freisetzung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie und leicht symptomatischem Herzversagen zeigten eine abgeschwächte ANP-Freisetzung in Reaktion auf intravasale Volumenexpansion.<sup>210,211</sup>

Die Ergebnisse des vorliegenden Versuchs zeigen, dass die bei der Herzinsuffizienz *in vivo* beobachtete veränderte Regulation der ANP-Freisetzung *in vitro* fortbesteht. Dies spricht für eine andauernde Störung der ANP-Freisetzung, die auch in Abwesenheit von hämodynamischer Überbelastung und ohne den Einfluss von zirkulierenden Hormonen weiterbesteht.

Der pathophysiologische Entstehungsmechanismus dieser Sekretionsminderung ist noch nicht geklärt. Da beim Shuntmodell an der Ratte normale bis erhöhte Werte für den ANP-Gehalt im linken Vorhof gemessen wurden<sup>237,238</sup>, erscheint die früher angenommene Depletion der ANP-Vorräte<sup>236</sup> in diesem Fall als Ursache unwahrscheinlich.

Mehrere Arbeiten deuten darauf hin, dass das bei Herzinsuffizienz aktivierte Angiotensin II eine Rolle spielen könnte. Sata et al.<sup>212</sup> untersuchten hierzu den Einfluss der Hemmung von angiotensinkonvertierendem Enzym (ACE) und von Angiotensin-Rezeptorantagonisten bei medikamentös induzierter Hypertonie an der Ratte. Dadurch wurde ein signifikanter Anstieg der ANP-Plasma-Konzentration sowie atrialer ANP-enthaltender Granula hervorgerufen.

Beim Shuntmodell an der Ratte konnte in vivo gezeigt werden, dass die abgeschwächte ANP-Freisetzung der Herzen operierter Tiere bei Volumenexpansion durch den ACE-Hemmer Ramipril wiederhergestellt wird.<sup>237</sup> Auch die Herzen von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie setzten bei Volumenexpansion unter ACE-Hemmung deutlich mehr ANP frei als die nicht behandelte Versuchsgruppe.<sup>211</sup> Angiotensin II scheint somit einen negativen Effekt auf die volumeninduzierte ANP-Freisetzung auszuüben.

Langenickel et al.<sup>204</sup> zeigten kürzlich, dass die Expression von Corin, einem Enzym welches ProANP zu sezernierbarem ANP und einem Spaltprodukt umwandelt, in den Vorhöfen shuntoperierter Ratten vermindert ist. Dabei könnte es sich um einen regulativen Mechanismus handeln, der zur abgeschwächten ANP-Freisetzung bei Vorhofdehnung beiträgt. Corin scheint bei der Herzinsuffizienz also in den Herzkammern induziert<sup>213</sup> und in den Vorhöfen vermindert exprimiert<sup>204</sup> zu werden.

Bisher liegen noch keine Studien vor, die sich mit regulatorischen Einflussfaktoren auf Corin beschäftigen. Im 2003 veröffentlichten Review von Ruskoaho<sup>192</sup> wurde allerdings eine differentielle Regulation der ANP-Genexpression in den Herzvorhöfen und den Herzkammern durch auto-, endo- und parakrine Faktoren angesprochen.

Mit Blick auf die möglicherweise ausschlaggebende Rolle von Corin bei der ANP-Freisetzung erscheint es sinnvoll, den Einfluss von derartigen Faktoren wie z.B. Angiotensin auf die Expression von Corin zu untersuchen. Er könnte die aktuell gezeigte Diskrepanz zwischen verstärkter ANP-Basalfreisetzung aus den Ventrikeln und abgeschwächter ANP-Freisetzung auf den Dehnungsreiz im linken Vorhof erklären.

#### **4.2.2 Koronarperfusion**

Die Koronarperfusion der Shunt- und Kontrollherzen nahm einen ganz ähnlichen Verlauf wie die ANP-Sekretion. Von erhöhtem Baselinenniveau ausgehend, glich das koronare Perfusionsvolumen der Herzen shuntoperierter Tiere unter Vorhofdehnung dem der Kontrollherzen. Dabei hatte

die Zuführung von Perfusat in den linken Vorhof neben atrialem Stretch auch den Effekt, dass das linke Herz nun aktiv Flüssigkeit förderte. Die bei Kontrollherzen beobachtete Zunahme der Koronarperfusion im Zeitraum der atrialen Dehnung ließe sich somit durch einen erhöhten Energie- und Sauerstoffverbrauch des kardialen Gewebes erklären, welcher auf bisher noch nicht vollständig geklärte Weise eine Dilatation der Koronararterien hervorrufen kann (eine Zusammenfassung der zur Diskussion stehenden Mediatoren wurde 2002 von Tune et al.<sup>222</sup> veröffentlicht).

Bei den Herzen von Shunttieren fand sich im Gegensatz dazu kein signifikanter Anstieg der Koronarperfusion. Unter atrialem Stretch wurden sie von ebensoviel Flüssigkeit durchflossen wie die Herzen der Kontrollgruppe. Verschiedene andere Arbeitsgruppen<sup>45-47</sup> haben bei insuffizienten Herzen ebenfalls einen abgeschwächten Anstieg der Koronarperfusion in Reaktion auf atriales Pacing und körperliches Training (als Zustände erhöhten metabolischen Bedarfs) beobachtet. Traverse et al.<sup>45</sup> setzten dies in Zusammenhang mit ebenfalls abgeschwächter O<sub>2</sub>-Aufnahme in insuffizientem kardialen Gewebe, für deren Ursache allerdings noch kein Erklärungsansatz existiert.

### **4.2.3 ANP – Konzentration**

Die relativen Veränderungen der ANP-Sekretion und der Koronarperfusion beider Versuchsgruppen unterlagen in diesem Versuch parallelen Schwankungen. Somit änderte sich die ANP-Konzentration im Perfusat bei Vorhofdehnung nicht.

Andere Arbeitsgruppen hatten durch Vorhofdehnung an isoliert perfundierten Rattenherzen normaler Herzfunktion eine Konzentrationserhöhung von ANP im Perfusat provoziert.<sup>231</sup> Dort wurde mit konstantem Perfusionsvolumen gearbeitet. Kongruent zu den vorliegenden Versuchsergebnissen wurde durch die Dehnung des Vorhofs eine Zunahme der ANP-Freisetzung bei Herzen von Ratten mit normaler Herzfunktion bewirkt. Da dies unter der im aktuellen Versuch variablen Koronarperfusion nicht zu einer Konzentrationsänderung im Perfusat führte, scheinen die Koronarperfusion und die ANP-Plasmakonzentration bei der akuten ANP-Freisetzung durch Vorhofdehnung eine untergeordnete Rolle zu spielen.

## **4.3 Versuch B: Stimulation der Proteinkinase C**

Bei der Herzinsuffizienz ist die basale ANP-Freisetzung erhöht, wodurch es zu einem Anstieg der Konzentrationen von biologisch aktivem ANP<sub>99-126</sub> und dem N-terminalen Peptid (ANP<sub>1-98</sub>) im Plasma kommt.<sup>63-67,188-191</sup> Wie diese verstärkte Freisetzung zu Stande kommt, ist noch nicht vollständig geklärt, die Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPgR) könnte dabei jedoch eine bedeutende Rolle spielen. Diese setzen (über die Aktivierung der PLC $\beta$   $\rightarrow$  DAG, IP<sub>3</sub>  $\rightarrow$  PKC  $\rightarrow$  MAP-Kinasen / noch unbekannte Effektoren mit konsekutiver Induktion von Hypertrophie-assoziierten Genprodukten) einen Transduktionsweg in Gang, der zur vermehrten Synthese von ANP beiträgt. Auch die ANP-Freisetzung aus den Kardiomyozyten scheint (via Prostaglandinwirkung?<sup>182-184</sup>) von intakter PKC-Funktion abhängig zu sein. So wurde unter Stimulation der Proteinkinase C in kardiomyozytären Zellkulturen<sup>171,229</sup> sowie am isoliert perfundierten Herzmodell<sup>230</sup> eine Steigerung der ANP-Freisetzung beobachtet. Kongruent dazu wurde die Freisetzung von ANP in atrialen Myozyten durch PKC-Inhibition vermindert.<sup>223</sup> Die getriggerte ANP-Sekretion durch ET-1<sup>171</sup>, Ang II<sup>235</sup>, ADH<sup>176</sup>,  $\alpha_1$ -Rezeptor-Agonisten<sup>157</sup>, sowie Gewebedehnung<sup>159</sup> fiel unter PKC-Inhibition geringer aus.

Da bei der Herzinsuffizienz eine Reihe von GPgR-bindenden Faktoren (wie ET-1, AngII, ADH und über  $\alpha$ -Rezeptoren auch Noradrenalin) aktiviert sind, war es von Interesse, eventuelle Unterschiede in der Regulation dieser Signalkaskade bei Herzinsuffizienz herauszuarbeiten.

Zu diesem Zweck wurde im vorliegenden Versuch die Proteinkinase C kontinuierlich mit PMA stimuliert und die ANP-Freisetzung ins Perfusat analysiert.

### **4.3.1 ANP – Freisetzung**

Durch die Stimulation der Proteinkinase C mit PMA zeigten sich deutliche Unterschiede in der ANP-Freisetzung zwischen den Versuchsgruppen. Bei den Herzen von Shunttieren kam es zu einem starken Abfall der Sekretion von ANP. Eine derartige Signalumkehrung wurde bislang nicht beschrieben. Eine PKC-Downregulation/Aktivitätsminderung durch protrahierte Einwirkung von PMA ist allerdings bekannt.<sup>224-227</sup> Es wäre demzufolge denkbar, dass permanent erhöhte Plasmafaktoren wie ET-1<sup>51-53</sup>, AngII<sup>54</sup>, ADH<sup>55</sup> und Noradrenalin<sup>49,50</sup> bei Herzinsuffizienz über eine protrahierte Stimulation der PKC zu deren Downregulation/Aktivitätsminderung beitragen und so zu einer Toleranzentwicklung gegenüber hormonellen Stimuli führen. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass die Koronarperfusion der Herzen von Shunttieren nicht

durch PKC-Stimulation beeinflusst wurde, die der Kontrollherzen dagegen deutlich. Auch das bei Herzinsuffizienz erhöhte ANP selbst kann NPR-A-vermittelt die PKC-Aktivität senken<sup>228</sup> und somit zu dem beschriebenen Phänomen beitragen. Eine Signalumkehrung ließe sich auf diese Weise jedoch nicht erklären. An der Veränderung der basalen ANP-Freisetzung bei Herzinsuffizienz müssen also noch andere Mechanismen beteiligt sein.

Es wäre zum Beispiel möglich, dass verschiedene PKC-Isoformen einen unterschiedlichen, eventuell sogar gegensätzlichen Einfluss auf die ANP-Freisetzung ausüben. In humanem Myokard sind PKC $\alpha$ ,  $\beta_{1/2}$ ,  $\delta$  sowie  $\epsilon$  nachgewiesen worden.<sup>35</sup> Sie gehören zu den konventionellen (cPKC:  $\alpha$ ,  $\beta$ ) und neuartigen (nPKC:  $\delta$  und  $\epsilon$ ) Proteinkinasen vom C-Typ und sind daher mit Diacylglycerol aktivierbar.<sup>30</sup> In dem aktuellen Versuch wurden durch DAG-Analogen PMA also alle dieser Unterformen stimuliert, wobei die Rolle hinsichtlich der ANP-Freisetzung nicht für jede einzelne geklärt ist. Kerkelä et al.<sup>36</sup> wiesen für die PKC  $\alpha$  kürzlich eine ausschlaggebende Funktion bei der ET-1 induzierten ANP- und BNP-Freisetzung nach. In den Prozess der Herzinsuffizienzentwicklung und -hypertrophie sind indes auch andere PKC-Isoformen involviert. So wurde in kardialen Myozyten bei humaner Herzinsuffizienz eine verstärkte Transkription des  $\beta$ -PKC-Gens gefunden.<sup>35</sup> Auch am druckinduzierten Insuffizienzmodell der Ratte konnte eine gesteigerte Aktivität von PKC $\beta$  sowie  $\epsilon$  gezeigt werden.<sup>37</sup> Es ist also nicht auszuschließen, dass die verschiedene Reaktion der Herzen aus Kontroll- und Shuntgruppe auf PMA-Einwirkung durch ein ungleiches Regulationsmuster der PKC-Subklassen bei Herzinsuffizienz hervorgerufen wird. Dahingehend wäre eine Funktionsanalyse der  $\beta$ - und  $\epsilon$ -PKC im Hinblick auf die ANP-Freisetzung aufschlussreich, denn ein negativer Einfluss ihrerseits könnte eine Erklärung für den Abfall der ANP-Sekretion der Herzen von Shunttieren unter PMA-Einwirkung darstellen.

Einen weiteren Ansatzpunkt bieten die unter 4.2 erwähnten Studien zur Rolle des Angiotensins bei der ANP-Freisetzung. Angiotensin aktiviert über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren die PKC<sup>31</sup> und zeigte bei normaler Herzfunktion<sup>178,179</sup> einen positiven Effekt auf die ANP-Freisetzung. Im Gegensatz dazu rief seine Wirkungsminderung durch ACE-Hemmer bzw. ATII-Rezeptorantagonisten bei medikamentös induzierter Hypertonie<sup>212</sup> eine Steigerung der basalen ANP-Plasmaspiegel und bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie<sup>211</sup> sowie am Shuntmodell der Ratte<sup>237</sup> eine Wiederherstellung der dehnungsinduzierten ANP-Freisetzung hervor. Diese gegensätzliche Wirkung von Angiotensin auf die ANP-Sekretion von gesunden bzw. insuffizienten Herzen könnte ein Ausdruck abweichend regulierter Proteinkinase C bei Herzinsuffizienz sein und die bei der Shuntgruppe beobachtete Signalumkehr bei PKC-Stimulation erklären.

Das exakte Zustandekommen der Unterschiede zwischen Shunt- und Kontrollgruppe lässt sich auf dem bisherigen Forschungsstand allerdings nicht klären. Die Ergebnisse des vorliegenden

Versuches deuten jedoch daraufhin, dass für die gesteigerte ANP-Basalfreisetzung im herzinsuffizienten Zustand andere Einflüsse, als die reine Stimulation der PKC (als Bestandteil der PKC-beinhaltenden Signalkaskade G-Protein-gekoppelter Rezeptoren), eine bedeutendere Rolle spielen.

#### 4.3.2 Integrative Diskussion der Parameter

In der Kontrollgruppe bewirkte die PKC-Stimulation keine signifikante Veränderung der **ANP-Freisetzung** im Vergleich zu den Vehikel-stimulierten Kontrollherzen. Isoliert betrachtet ist dies ein unerwartetes Ergebnis, denn sowohl in kardiomyozytären Zellkulturen<sup>171,229</sup> als auch am isoliert perfundierten Herzmodell<sup>230</sup> wurde in der Vergangenheit ein positiver Effekt von PMA auf die ANP-Freisetzung demonstriert. Zur Annäherung an diese Problematik erwies es sich als sinnvoll, die aktuellen Versuchsbedingungen zunächst mit denen von Ruskoaho et al.<sup>230</sup> zu vergleichen, die mit einem analogen Herzmodell gearbeitet hatten. Die Gruppe stimulierte ebenfalls die Proteinkinase C mit PMA (Synonym: TPA) in isoliert perfundierten Rattenherzen und konnten einen Anstieg auf das circa Vierfache der Baseline durch PMA-Einwirkung nachweisen. Der Versuchsaufbau war prinzipiell ähnlich: die Proteinkinase C in retrograd perfundierten Rattenherzen wurde durch PMA-Beimengung zum Perfusat kontinuierlich stimuliert. Der einzige Unterschied zu den vorliegenden Versuchsbedingungen bestand in der **Koronarperfusion** unter konstanten Flussbedingungen, während die in unserem Labor verwendete Apparatur den Druck konstant hielt. Dies ist insofern von Bedeutung, als dass die PMA-sensible PKC $\epsilon$  an Gefäßmuskelnzellen eine Vasokonstriktion infolge GPgR-Stimulation vermittelt (ausführlich diskutiert von Walsh et al.<sup>38</sup>).

Dieser Umstand bewirkt bei der Durchströmung isolierter Herzen mit PMA-haltiger Flüssigkeit eine Gefäßverengung, wodurch es im aktuellen Versuch zu einer starken Abnahme des koronaren Perfusionsvolumens von Kontrollherzen kam. Auch die Koronarperfusion Vehikel-stimulierter Kontrollherzen nahm über den Zeitverlauf von 60 Minuten kontinuierlich ab, was damit zusammenhängen könnte, dass das zugeführte Perfusat komplett frei von Plasmafaktoren war, welche den Gefäßtonus in vivo modulieren. Die Veränderung der Koronarperfusion der Vehikel-Gruppe war jedoch weitaus weniger ausgeprägt, als das in der PMA-stimulierten Kontrollgruppe der Fall war. Die Abnahme des koronaren Perfusionsvolumens war bei Herzen von Shunttieren etwas stärker als bei den Vehikel-stimulierten Kontrollen und steht in Kongruenz mit der Annahme, dass die koronarkonstruktiven Mechanismen bei der Herzinsuffizienz stärker akti-

viert sind, als im gesunden Zustand<sup>41</sup>. Ganz im Gegensatz zu den herzgesunden Kontrollen gab es in der Shuntgruppe allerdings keine signifikanten Unterschiede in der Koronarperfusion zwischen PMA- und Vehikel-stimulierter Versuchsgruppe. Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass die Regulation der Proteinkinase C in koronaren Gefäßmuskelzellen bei der Herzinsuffizienz verändert ist. Mit Bezug auf die Koronarperfusion kam es im vorliegenden Versuch somit zu ausgeprägten Abweichungen in der Hämodynamik der betrachteten Versuchsgruppen.

Auf die Experimente von Ruskoaho et al.<sup>230</sup> zurückkommend, liegt in der Hämodynamik ein großer Unterschied zwischen den Versuchsbedingungen in dieser Arbeitsgruppe und denen des aktuellen Experiments. Auch in deren Versuchen kam es zu einer Gefäßverengung in normalen Herzen in Reaktion auf PMA. Da allerdings unter konstanten Flussbedingungen gearbeitet wurde, bewirkte dies keine Absenkung der Koronarperfusion, sondern es wurde durchgehend das gleiche Volumen gegen den infolge Vasokonstriktion ansteigenden Druck in die Aa. coronariae gepresst. Diesen Sachverhalt beschrieben Ruskoaho et al. auch in ihrem einige Jahre später veröffentlichten Artikel<sup>231</sup>, in dem über Experimente mit ähnlicher Versuchsanordnung berichtet wird. Unter derartig konstantem Perfusionsvolumen ist ein Anstieg der **ANP-Konzentration** im Perfusat auch als Anstieg der ANP-Freisetzung zu werten und wurde bisher ausschließlich unter diesem Aspekt diskutiert. Da die Koronarperfusion im gegenwärtigen Versuch variabel war, besteht bei dieser Versuchsanordnung nun die Möglichkeit, die gegenseitige Abhängigkeit von der ANP-Freisetzung und der ANP-Konzentration im Perfusat (als Modell für die ANP-Plasmaspiegel in vivo) zu untersuchen. Tatsächlich zeigte sich für die Kontrollgruppe des konkreten Versuchs ein starkes Ansteigen der ANP-Konzentration im Perfusat durch PMA-Stimulation. Quantitativ stieg sie in etwa auf das Vierfache der Baseline, was den Ergebnissen von Ruskoaho et al.<sup>230</sup> entspricht. Dieser Sachverhalt impliziert, dass die basale ANP-Freisetzung möglicherweise in Abhängigkeit von der ANP-Plasmakonzentration über eine Modulation der PKC-Aktivität reguliert wird. Ein solcher Feed-Back-Mechanismus erfordert nunmehr ein Bindeglied zwischen zirkulierenden ANP-Molekülen und den sezernierenden Kardiomyozyten – z.B. in Form eines NP-Rezeptors. Für ANP beträfe dies den NPR-C und den NPR-A. Bei NPR-C knockout Mäusen konnte kein Unterschied der basalen ANP-Plasmaspiegel im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden.<sup>109</sup> Das Interesse konzentriert sich somit auf den NPR-A, von dem Leskinen et al.<sup>232</sup> in der Tat das Eingebundensein in einen negativen Feed-Back-Mechanismus von ANP auf seine eigene Freisetzung nachweisen konnten.

Interessanterweise wurden auch für die NO-Wirkung Unterschiede in Abhängigkeit von konstanten Druck- versus konstanten Flussbedingungen festgestellt.<sup>233</sup> Da eine Stimulation der endothelialen NO-Synthase via NPR-A<sup>111,234</sup> sowie eine negative Modulation der ANP-Freisetzung

durch NO<sup>185,186</sup> bereits bekannt sind, könnte endothelial synthetisiertes Stickstoffmonoxid einen mutmaßlichen Mediator der Modulation der ANP-Freisetzung in Abhängigkeit von seiner Plasmakonzentration darstellen. Diese theoretischen Schlussfolgerungen bedürfen freilich weiterer experimenteller Bestätigung.

Die ANP-Konzentration im Perfusat änderte sich bei den insuffizienten Herzen von Shunttieren unter PKC-Stimulation nicht. Dies könnte dadurch hervorgerufen werden, dass die PKC-einschließende Signalkaskade durch das vermehrte Vorliegen GPgR-Liganden im Plasma nicht weiter stimulierbar ist. Da die ANP-Freisetzung unter PMA-Einwirkung jedoch kontinuierlich abfiel, scheint bei der Herzinsuffizienz eine Änderung in der Regulation der PKC-beinhaltenden Signalkaskade vorzuliegen.

Demnach deuten die Ergebnisse des vorliegenden Versuchs daraufhin, dass die ANP-Freisetzung über die Proteinkinase C möglicherweise in Abhängigkeit von den ANP-Spiegeln im Plasma reguliert wird und dass dieser Regulationsmechanismus bei der Herzinsuffizienz verändert zu sein scheint. Es wurde demonstriert, dass erhöhte ANP-Plasmakonzentrationen bei Herzinsuffizienz z.T. durch die abweichende Regulation der Proteinkinase C erklärt werden können.

Die durchgeführten Versuche zeigen am Shuntmodell der Ratte, dass die basale ANP-Freisetzung bei Herzinsuffizienz erhöht ist. Bei Vorhofdehnung als adäquaten Sekretionsreiz wird sie jedoch nicht gesteigert. Die ANP-Sekretion am insuffizienten Herzen ist im Vergleich zur normalen Herzfunktion somit verändert. Als regulatorische Komponente kommt dabei die Proteinkinase C in Frage, da sekretionsfördernde Faktoren bei normaler Herzfunktion über die PKC zu einer ANP-Freisetzung führen. Die vorliegenden Versuche haben gezeigt, dass die PKC-Stimulation bei der Herzinsuffizienz zu einer Abnahme der basalen ANP-Freisetzung führt. Damit wurde der Verdacht erhärtet, dass die Proteinkinase C in die Regulation der ANP-Freisetzung bei der Herzinsuffizienz involviert ist.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Im Zuge der Entwicklung einer Herzinsuffizienz kommt es zur verstärkten Freisetzung von Faktoren mit vasokonstriktiven, flüssigkeitsretinierenden sowie kardiohypertrophen Eigenschaften. Gegenspieler dieses chronisch zur kardialen Überbeanspruchung führenden Systems sind unter anderem die kardioprotektiv wirksamen natriuretischen Peptide, darunter das atriale natriuretische Peptid (ANP). ANP wird vorwiegend aus dem Herzen freigesetzt und weist bei kardialer Insuffizienz erhöhte Plasmaspiegel auf. Sein adäquater Sekretionsreiz ist die atriale Dehnung, die bei Herzinsuffizienz *in vivo* nur in abgeschwächter Form zur ANP-Freisetzung führt. Daneben steigern verschiedene Agenzien über rezeptorvermittelte Stimulation der Proteinkinase C die ANP-Freisetzung. Die durchgeführten Versuche analysieren zum einen die dehnungsinduzierte Freisetzung von ANP und zum anderen die Rolle der Proteinkinase C bei seiner basalen Sekretion im Vergleich von Herzinsuffizienz zur normalen Herzfunktion.

Dazu kam der aortokavale Shunt an der Ratte als Modell der volumeninduzierten Herzinsuffizienz zur Anwendung. Die Herzen wurden isoliert schlagend untersucht und dabei die Koronarperfusion sowie die ANP-Konzentration im Perfusat bestimmt und in Bezug auf die ANP-Freisetzung der Herzen diskutiert. Eine Vorhofdehnung wurde durch linksatriale Druckerhöhung erreicht. Der Einfluss der Proteinkinase C auf die basale ANP-Freisetzung konnte durch Stimulation mit dem Phorbolster PMA analysiert werden.

Die basale Freisetzung von ANP war in der Shuntgruppe höher als in der Kontrollgruppe. Bei der Herzinsuffizienz kommt es somit zu einer Steigerung der ANP-Sekretion, welche die erhöhten ANP-Plasmaspiegel bei herzinsuffizienten Patienten erklären könnte.

Während die Vorhofdehnung in der Kontrollgruppe eine signifikante Zunahme der ANP-Freisetzung verursachte, blieb die ANP-Sekretion der Shuntgruppe unverändert. Die bei der Herzinsuffizienz *in vivo* beobachtete veränderte Regulation der ANP-Freisetzung besteht somit auch *in vitro* fort. Dies spricht für eine andauernde Störung der ANP-Freisetzung, die auch in Abwesenheit von hämodynamischer Überlastung und ohne den Einfluss von zirkulierenden Hormonen weiterbesteht.

Die Stimulation der Proteinkinase C (PKC) veränderte die basale ANP-Freisetzung der Kontrollherzen nicht. In der Shuntgruppe wurde die ANP-Freisetzung durch PKC-Stimulation signifikant abgeschwächt. Im herzinsuffizienten Zustand ist die Rolle der Proteinkinase C bei der ANP-Freisetzung demnach verändert. Das Shuntmodell der Herzinsuffizienz zeigt somit trotz erhöhter basaler ANP-Freisetzung gegenüber den Kontrollen eine abgeschwächte ANP-Sekretion bei atri-

aler Dehnung sowie eine negative Modulation der basalen ANP-Sekretion durch PKC-Stimulation.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Braunwald E, Hauci AS, Kasper DL, et al.: *Harrisons Innere Medizin Band 1* (deutsche Auflage in Zusammenarbeit mit der Charité). Mc Graw-Hill ABW Wissenschaftsverlag GmbH. 2003; 1451-1456.
- 2 Statistisches Bundesamt Deutschland: Sterbefälle nach den 10 häufigsten Todesursachen 2001. <http://www.destatis.de/basis/d/gesu/gesutab20.htm>.
- 3 Francis GS: Pathophysiology of Chronic Heart Failure. *Am J Med.* 2001; *110(7A)*:37S-46S.
- 4 Ho KKL, Anderson KM, Kannel WB, et al.: Survival after the onset of congestive heart failure in Framingham Heart Study subjects. *Circulation.* 1993; *88*:107-115.
- 5 Ho KKL, Pinsky JL, Kannel WB, et al.: The epidemiology of heart failure. The Framingham Study. *J Am Coll Cardiol.* 1993; *22*:6A-13A.
- 6 Braunwald E, Zipes DP, Libby P: *Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine* (6th Edition). W.B. Saunders Company. Philadelphia, London, New York, St. Louis, Sydney, Toronto. 2001; 503-533.
- 7 ter Keurs HE: Heart failure and Starling's Law of the Heart. *Can J Cardiol.* 1996; *12(10)*:1047-1057.
- 8 Grossman W, Jones D, McLaurin LP: Wall stress patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest.* 1975; *56*:566-5664.
- 9 Anversa P, Ricci R, Olivetti R: Quantitative structural analysis of the myocardium during physiologic growth and induced cardiac hypertrophy: A review. *J Am Coll Cardiol.* 1987; *7*:1140-1149.
- 10 St. John Sutton MG, Sharpe N: Left ventricular remodeling after myocardial infarction: Pathophysiology and therapy. *Circulation.* 2000; *101*:2981-2988.
- 11 Piano MR, Bondmass M, Schwertz DW: The molecular and cellular pathophysiology of heart failure. *Heart Lung.* 1998; *27*:3-19.
- 12 Morkin E: Postnatal muscle fiber assembly: localisation of newly synthesized myofibrillar proteins. *Science.* 1970; *167*:1499-1501.
- 13 Gerdes AM, Campbell SE, Hilbelink DR: Structural remodeling of cardiac myocytes in rats with arteriovenous fistulas. *Lab Invest.* 1988; *59*:5857-59861.
- 14 Kannel WB, Gordon T, Offutt D: Left ventricular hypertrophy by electrocardiogram. Prevalence, incidence, and mortality in the framingham study. *Ann Intern Med.* 1969; *71*:89-105.

- 15 Levy D, Garrison RJ, Savage D, et al.: Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med.* 1990; *322*:1561-1566.
- 16 Vakili BA, Okin PM, Devereux RB: Prognostic implications of left ventricular hypertrophy. *Am Heart J.* 2001; *141*:334-341.
- 17 Sussman MA, McCulloch A, Borg TK: Dance Band on the Titanic: Biomechanical Signaling in Cardiac Hypertrophy. *Circ Res.* 2002; *91*:888-898.
- 18 Log CS, Kariya K, Karns L, et al.: Sympathetic activity: modulator of myocardial hypertrophy. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1991; *17(suppl2)*:S20-S24.
- 19 Simpson PC, Kariya K, Karns LR, et al.: Adrenergic hormones and control of cardiac myocyte growth. *Mol Cell Biochem.* 1991; *104*:35-43.
- 20 Parker TG, Packer SE, Schneider MD: Peptide growth factors can provoke "fetal" contractile protein gene expression in rat cardiac myocytes. *J Clin Invest.* 1990; *85*:507-514.
- 21 Parker TG, Chow KL, Schwartz RJ, et al.: Positive and negative control of the skeletal alpha-actin promoter in cardiac muscle. A proximal serum response element is sufficient for induction by basic fibroblast growth factor (FGF) but not for inhibition by acidic FGF. *J Biol Chem.* 1992; *267*:3343-3350.
- 22 Ito H, Hiroe M, Hirata Y, et al.: Insulin-like growth factor-1 induces hypertrophy with enhanced expression of muscle specific genes in cultured rat cardiomyocytes. *Circulation.* 1993; *87*:1715-1721.
- 23 Lavandero S, Foncea R, Pérez V, et al.: Effect of inhibitors of signal transduction on IGF-1-induced protein synthesis associated with hypertrophy in cultured neonatal rat ventricular myocytes. *FEBS Lett.* 1998; *422*:193-196.
- 24 Ebensperger R, Acevedo E, Melendez, et al.: Selective increase in cardiac IGF-1 in rat model of ventricular hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; *243*:20-24.
- 25 Sugden PH, Fuller SJ: Regulation of protein turnover in skeletal and cardiac muscle. *Biochem J.* 1991; *273*:21-37.
- 26 Hannan RD, Rothblum LI: Regulation of ribosomal DNA transcription during neonatal cardiomyocyte hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 1995; *30*:501-510.
- 27 Sutton MG, Sharpe N: Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation.* 2000; *101(25)*:2981-2988.
- 28 Cameron VA, Ellmers LJ: Minireview: natriuretic peptides during development of the fetal heart and circulation. *Endocrinology.* 2003; *144(6)*:2191-2194.
- 29 Calderone A, Takahashi N, Izzo NJ Jr, et al.: Pressure- and volume-induced left ventricular hypertrophies are associated with distinct myocytes phenotypes and differential induction of peptide growth factor mRNAs. *Circulation.* 1995; *92*:2385-2390.

- 30 Frey N, Olson EN: Cardiac hypertrophy: The good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol.* 2003; 6545-6579.
- 31 Jalili T, Takeishi Y, Walsh RA: Signal transduction during cardiac hypertrophy: the role of Gαq, PLC β I, and PKC. *Cardiovasc Res.* 1999; 44:5-9.
- 32 Sugden PH, Clerk A: Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *J Mol Med.* 1998; 76:725-746.
- 33 Simpson PC: Beta-PKC and hypertrophic signaling in human heart failure. *Circulation.* 1999; 99:334-337.
- 34 Disatnik MH, Buraggi G, Mochly-Rosen D: Localization of protein kinase C isozymes in cardiac myocytes. *Exp Cell Res.* 1994; 210:287-297.
- 35 Bowling N, Walsh RA, Song G, et al.: Increased protein kinase C activity and expression of Ca-sensitive isoforms in the failing human heart. *Circulation.* 1999; 99:384-391.
- 36 Kerkelä R, Ilves M, Pikkarainen S, et al.: Identification of PKCα isoform specific effects in cardiac myocytes using antisense phosphorothioate oligonucleotides. *Mol Pharmacol.* 2002; 62:1482-1492.
- 37 Gu X, Bishop SP: Increased protein kinase C and isozyme redistribution in pressure-overload cardiac hypertrophy in the rat. *Circ Res.* 1994; 75:926-931.
- 38 Walsh MP, Horowitz A, Clément-Chomienne O, et al.: Protein kinase C mediation of Ca<sup>2+</sup>-independent contractions of vascular smooth muscle. *Biochem Cell Biol.* 1996; 74:485-502.
- 39 Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, et al.: Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem.* 1982; 257:7847-7851.
- 40 Pucéat M, Vassort G: Signalling by protein kinase C isoforms in the heart. *Mol Cell Biochem.* 1996; 157:65-72.
- 41 Brutsaert DL: Cardiac endothelial-myocardial signaling: its role in cardiac growth, contractile performance, and rhythmicity. *Physiol Rev.* 2003; 83:59-115.
- 42 Parodi O, DeMaria R, Oltrona L, et al.: Myocardial blood flow distribution in patients with ischemic heart disease or dilated cardiomyopathy undergoing heart transplantation. *Circulation.* 1993; 88:509-522.
- 43 Opherk D, Schwartz F, Mall G, et al.: Coronary dilatory capacity in idiopathic dilated cardiomyopathy: analysis of 16 patients. *Am J Cardiol.* 1983; 51:1657-1662.
- 44 Nitenberg A, Foults JM, Blanchet F, et al.: Multifactorial determinants of reduced coronary flow reserve after dipyridamol in dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 1985; 55:748-754.

- 45 Traverse JH, Melchert P, Pierpont GL, et al.: Regulation of myocardial blood flow by oxygen consumption is maintained in the failing heart during exercise. *Circ Res.* 1999; 84:401-408.
- 46 Spinale FG, Tanaka R, Crawford FA, et al.: Changes in myocardial blood flow during development of and recovery from tachycardia-induced cardiomyopathy. *Circulation.* 1992; 85:717-729.
- 47 Shannon RP, Komamura K, Shen Y, et al.: Impaired regional subendocardial coronary flow reserve in conscious dogs with pacing-induced heart failure. *Am J Physiol.* 1993; 265:H801-H809.
- 48 Anversa P, Olivetti G, Melissari M, et al.: Stereological measurement of cellular and sub-cellular hypertrophy and hyperplasia in the papillary muscle of adult rat. *J Mol Cell Cardiol.* 1980; 12:781-795.
- 49 Davis D, Baily R, Zelis R: Abnormalities in systemic norepinephrine kinetics in human congestive heart failure. *Am J Physiol.* 1988; 254:E760-E766.
- 50 Hasking GJ, Esler MD, Jennings GL, et al.: Norepinephrine spillover to plasma in patients with congestive heart failure: evidence of increased overall and cardiorenal sympathetic nervous activity. *Circulation.* 1986; 73:615-620.
- 51 Rodeheffer RJ, Lerman A, Heublein DM, et al.: Increased plasma concentration of endothelin in congestive heart failure in humans. *Mayo Clin Proc.* 1992; 67:719-724.
- 52 Margulies KF, Hildebrand FL Jr, Lerman A, et al.: Increased endothelin in experimental heart failure. *Circulation.* 1990; 82:2226-2230.
- 53 Wei CM, Lerman A, Rodeheffer RJ, et al.: Endothelin in human congestive heart failure. *Circulation.* 1994; 89:1580-1586.
- 54 Dzau VJ, Colucci WS, Hollenberg NK, et al.: Relation of the renin-angiotensin-aldosterone system to clinical state in congestive heart failure. *Circulation.* 1981; 93:645-651.
- 55 Goldsmith SR, Francis GS, Cowley AW, et al.: Increased plasma arginine vasopressin in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 1983; 1:1385-1390.
- 56 Heart Disease. A Textbook of Cardiovascular Medicine 5th Ed. Philadelphia W.B. Saunders Company. 1996; 394-420.
- 57 Atlas SA, Kleinert HD, Camargo MJ, et al.: Purification, sequencing and synthesis of natriuretic and vasoactive rat atrial peptide. *Nature.* 1984; 309:717-719.
- 58 Marcus LS, Hart D, Packer M, et al.: Hemodynamic and renal excretory effects of human brain natriuretic peptide infusion in patients with congestive heart failure: a double-blind, placebo-controlled randomized crossover trial. *Circulation.* 1996; 94:3184-3189.

- 59 Melo LG, Veress AT, Ackerman U, et al.: Chronic hypertension in ANP knockout mice: contribution of peripheral resistance. *Regul Pept.* 1999; 79:109-115.
- 60 Silberbach M, Gorenc T, Hershberger RE, et al.: Extracellular signal-regulated protein kinase activation is required for the antihypertrophic effect of atrial natriuretic factor in neonatal rat ventricular myocytes. *J Biol Chem.* 1999; 274(35):24858-24864.
- 61 Horio T, Nishikimi T, Yoshihara F, et al.: Inhibitory regulation of hypertrophy by endogenous atrial natriuretic peptide in cultured cardiac myocytes. *Hypertension.* 2000; 35(1):19-24.
- 62 Calderone A, Thaik CM, Takahashi N, et al.: Nitric oxide, atrial natriuretic peptide, and cyclic GMP inhibit the growth-promoting effects of norepinephrine in cardiac myocytes and fibroblasts. *J Clin Invest.* 1998; 101(4):812-818.
- 63 Nakaoka H, Imitaka K, Amano M, et al.: Plasma levels of atrial natriuretic factor in patients with congestive heart failure. *N Engl J Med.* 1985; 313:892-893.
- 64 Tikkanen J, Fyhrquist F, Metsarinne K, et al.: Plasma atrial natriuretic peptide in cardiac disease and during infusion in healthy subjects. *Lancet.* 1985; *ii*:66-69.
- 65 Burnett Jr JC, Kao PC, Hu DC, et al.: Atrial natriuretic peptide elevation in congestive heart failure in the human. *Science.* 1986; 231:1145-1147.
- 66 Clerico A, Iervasi G, Del Chicca MG, et al.: Circulating levels of cardiac natriuretic peptides (ANP and BNP) measured by highly sensitive and specific immunoradiometric assay in normal subjects and in patients with different degrees of heart failure. *J Endocrinol Invest.* 1998; 21:170-179.
- 67 Wijbenga JAM, Balk AHMM, Jonkman FAM, et al.: Relation of atrial natriuretic peptides to left ventricular systolic and diastolic function in heart failure. *Eur J Hear Failure.* 1999; 1:51-58.
- 68 Habib F, Dukta D, Crossman D, et al.: Enhanced basal nitric oxide production in heart failure: another failed counter-regulatory vasodilator mechanism? *Lancet.* 1994; 344:371-373.
- 69 Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, et al.: Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993; 192:553-560.
- 70 Kobayashi K, Kitamura K, Etoh T, et al.: Increased plasma adrenomedullin levels in chronic congestive heart failure. *Am Heart J.* 1996; 131:994-998.
- 71 Nishikimi T, Saito Y, Kitamura K, et al.: Increased plasma levels of adrenomedullin in patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 1995; 26:1424-1431.
- 72 Cheng C-P, Onishi K, Othe N, et al.: Functional effects of endogenous bradykinin in congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 1998; 31:1679-1686.

- 73 Dzau VJ, Packer M, Lilly LS, et al.: Prostaglandins in severe congestive heart failure. *N Engl J Med.* 1984; *310*:347-352.
- 74 Kirsch B: Electron microscopy of the atrium of the heart. *Exp Med Surg.* 1956; *14*:99-111.
- 75 de Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, et al.: A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci.* 1981; *8*:89-94.
- 76 Kangawa K, Matsuo H: Purification and complete amino acid sequence of alpha-human atrial natriuretic polypeptide (alpha-hANP). *Biochem Biophys Res Commun.* 1984; *118*:131-139.
- 77 Flynn TG, de Bold ML, de Bold AJ: The amino acid sequence of an atrial peptide with potent diuretic and natriuretic properties. *Biochem Biophys Res Commun.* 1983; *117*:859-865.
- 78 Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, et al.: A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature.* 1988; *332*:78-81.
- 79 Kambayashi Y, Nakao K, Mukoyama M, et al.: Isolation and sequence determination of human brain natriuretic peptide in human atrium. *FEBS Lett.* 1990; *259*:341-345.
- 80 Schulz-Knappe P, Forssmann K, Herbst F, et al.: Isolation and structural analysis of "urodilatin", a new peptide of the cardiodilatin-(ANP)-family, extracted from human urine. *Klin Wochenschr.* 1988; *66*:752-759.
- 81 Totsune K, Takahashi K, Murakami O, et al.: Natriuretic peptides in the human kidney. *Hypertension.* 1994; *24*:758-762.
- 82 Meyer M, Richter R, Brunkhorst, et al.: Urodilatin is involved in sodium homeostasis and exerts sodium-state-dependent natriuretic and diuretic effects. *Am J Physiol.* 1996; *271*:F489-F497.
- 83 Sudoh T, Minamino N, Kangawa K, et al.: C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990; *168*:863-870.
- 84 Brown J, Zuo Z: C-type natriuretic peptide and atrial natriuretic peptide receptors of rat brain. *Am J Physiol.* 1993; *264*:R513-R523.
- 85 Ueda S, Minamino N, Aburaya M, et al.: Distribution and characterization of immunoreactive porcine C-type natriuretic peptide. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991; *175*:759-767.
- 86 Komatsu Y, Nakao K, Suga S, et al.: C-type natriuretic peptide (CNP) in rats and humans. *Endocrinology.* 1991; *129*:1104.
- 87 Banks M, Wei C-M, Kim Ch, et al.: Mechanism of relaxations to C-type natriuretic peptide in veins. *Am J Physiol.* 1996; *271*:H1907-H1911.

- 88** Schweitz H, Vigne P, Moinier D, et al.: A new member of the natriuretic peptide family is present in the venom of the green mamba (*dendroaspis angusticeps*). *J Biochem.* 1992; *267*:13928-13932.
- 89** Schirger JA, Heublein DM, Chen HH, et al.: Presence of *Dendroaspis* natriuretic peptide-like immunoreactivity in human plasma and its increase during human heart failure. *Mayo Clin Proc.* 1999; *74*:126-130.
- 90** Inagami T, Misono Ks, Fukumi H, et al.: Structure and physiological actions of rat atrial natriuretic factor. *Hypertension.* 1987; *10(5)*:1113-1117.
- 91** Nakao K, Ogawa Y, Suga S, et al.: Molecular biology and biochemistry of the natriuretic peptide system. II: Natriuretic peptide receptors. *J Hypertens.* 1992; *10*:1111-1114.
- 92** Itoh H, Sagawa N, Hasegawa M, et al.: Expression of biologically active receptors for natriuretic peptides in the human uterus during pregnancy. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994; *203*:206-207.
- 93** Boomsma F, Wijbenga A, Jonkman F, et al.: Neurohormonal activation addressed and at peak exercise in patients with congestive heart failure (NYHA class 1-3). *J Hypertens.* 1998; *16(suppl 2)*:S230, (Abstract).
- 94** Konrad EM, Thibault G, Schiffrin EL, et al.: Atrial natriuretic factor receptor subtypes in the rat central nervous system. *Hypertension.* 1991; *17*:1144-1151.
- 95** Drewett JG, Garbers DL: The family of guanylyl cyclase receptors and their ligands. *Endocr Rev.* 1994; *15(2)*:135-162.
- 96** Maack T, Suzuki M, Almeida FA, et al.: Physiological role of silent receptors of atrial natriuretic factor. *Science.* 1987; *238*:675-678.
- 97** Wilcox JN, Augustine A, Goeddel DV, et al.: Differential regional expression of three natriuretic peptide receptor genes within primate tissues. *Mol Cell Biol.* 1991; *11(7)*:3454-3462.
- 98** Hollister AS, Rodeheffer RJ, White FJ, et al.: Clearance of natriuretic factor by lung, liver, and kidney in human subjects and the dog. *J Clin Invest.* 1989; *83(2)*:623-628.
- 99** Cerra MC: Cardiac distribution of the binding sites for natriuretic peptides in vertebrates. *Cardioscience.* 1994; *5(4)*:215-224.
- 100** Matsukawa N, Grzesik WJ, Takahashi N, et al.: The natriuretic peptide clearance receptor locally modulates the physiological effects of the natriuretic peptide system. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; *96(13)*:7403-7408.
- 101** Schulz S, Singh S, Bellet RA, et al.: The primary structure of a plasma membrane guanylate cyclase demonstrates diversity within this new receptor family. *Cell.* 1989; *58*:1155-1162.

- 102** Tremblay J, Desjardins R, Hum D, et al.: Biochemistry and physiology of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclases. *Mol Cell Biochem.* 2002; *230*:31-47.
- 103** Koller KJ, Lowe DG, Bennett GL: Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP). *Science.* 1991; *252*:120-123.
- 104** Hirata Y, Emori T, Ohta K, et al.: Vasoconstrictor-induced heterologous down-regulation of vascular atrial natriuretic peptide receptor. *Eur J Pharmacol.* 1989; *164*:603-606.
- 105** Misono KS: Atrial natriuretic factor binding to its receptor is dependent on chloride concentration: A possible feedback-control mechanism in renal salt regulation. *Circ Res.* 2000; *86*:1135-1139.
- 106** Anand-Srivastava MB: Atrial natriuretic peptide-C receptor and membrane signalling in hypertension. *J Hypertens.* 1997; *15*:815-826.
- 107** Suga S, Nakao K, Hosoda K, et al.: Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and C-type natriuretic peptide. *Endocrinology.* 1992; *130*(1):229-239.
- 108** Nussenzveig DR, Lewicki JA, Maack T: Cellular mechanism of the clearance function of type C receptors of atrial natriuretic factor. *J Biol Chem.* 1990; *265*:20952-20958.
- 109** Matsukawa N, Grzesik WJ, Takahashi, et al.: The natriuretic peptide clearance receptor locally modulates the physiological effects of natriuretic peptide system. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; *96*:7403-7408.
- 110** Kashiwagi M, Katafuchi T, Kato A, et al.: Cloning and properties of a novel natriuretic peptide receptor, NPR-D. *Eur J Biochem.* 1995; *233*:102-109.
- 111** Ravichandran LV, Johns RA: Upregulation of endothelial nitric oxide synthase expression by cyclic guanosine 3'-5' monophosphate. *FEBS Lett.* 1995; *374*:295-298.
- 112** Marin-Grez M, Fleming JT, Steinhausen M: Atrial natriuretic peptide causes pre-glomerular vasodilation and post-glomerular vasoconstriction in rat kidney. *Nature.* 1986; *324*:473-476.
- 113** Sonnenberg H, Honrath U, Chong CK, et al.: Atrial natriuretic factor inhibits sodium transport in medullary collecting duct. *Am J Physiol.* 1986; *250*:F963-F966.
- 114** McMurray J, Seidelin PH, Struthers AD: Evidence for a proximal and distal nephron action of atrial natriuretic factor in man. *Nephron.* 1989; *51*:39-43.
- 115** Dillingham MA, Anderson RJ: Inhibition of vasopressin action by atrial natriuretic factor. *Science.* 1986; *231*:1572-1573.
- 116** Volpe M, Odell G, Kleinert HA, et al.: Effect of atrial natriuretic factor (ANF) on blood pressure, renin and aldosterone in Goldblatt hypertension. *Hypertension.* 1985; *7*(suppl 1):43-48.

- 117 Cuneo RC, Espiner EA, Nicholls MG, et al.: Effect of physiological levels of atrial natriuretic peptide on hormone secretion: Inhibition of angiotensin-induced aldosterone secretion and renin release in normal man. *J Clin Endocrinol Metab.* 1987; *65*:765-772.
- 118 Pfaffendorf M: Atriales natriuretisches peptid als angiotensin-II-antagonist. *Med Mol Pharm.* 1992; *15*:169-178.
- 119 Levin ER, Gardner DG, Samson WK: Mechanisms of disease: natriuretic peptide. *N Engl J Med.* 1998; *339*:321-328.
- 120 Calderone A: The therapeutic effect of natriuretic peptides in heart failure; differential regulation of endothelial inducible nitric oxide synthase *Heart Failure. Reviews.* 2003; *8*:55-70.
- 121 Wijeyaratne CN, Moulton PJA: The effect of alpha human atrial natriuretic peptide on plasma volume in vascular permeability in normotensive subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993; *76*:343-346.
- 122 Morishita R, Gibbons GH, Pratt RE, et al.: Autocrine and paracrine effects of atrial natriuretic peptide gene transfer on vascular smooth muscle and endothelial cellular growth. *J Clin Invest.* 1994; *94*(2):824-829.
- 123 Hutchinson HG, Trindade PT, Cunanan DB, et al.: Mechanisms of natriuretic-peptide-induced growth inhibition of vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res.* 1997; *35*(1):158-167.
- 124 Suhasini M, Li H, Lohmann SM, et al.: Cyclic-GMP-dependent protein kinase inhibits the Ras/Mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol.* 1998; *18*(12):6983-6994.
- 125 Cao L, Gardner DG: Natriuretic peptides inhibit DNA synthesis in cardiac fibroblasts. *Hypertension.* 1995; *25*:227-234.
- 126 Redondo J, Bishop JE, Wilkins MR, et al.: Effect of atrial natriuretic peptide and cyclic GMP phosphodiesterase inhibition on collagen synthesis by adult cardiac fibroblasts. *J Pharmacol.* 1998; *124*(7):1455-1462.
- 127 Sengenès C, Berlan M, De Gliszinski I, et al.: Natriuretic peptides: A new lipolytic pathway in human adipocytes. *FASEB J.* 2000; *14*:1345-1351.
- 128 Sugimoto T, Kikkawa R, Haneda M, et al.: Atrial natriuretic peptide inhibits endothelin-1-induced activation of mitogen-activated protein kinase in cultured rat mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993; *195*(1):72-78.
- 129 Isono M, Haneda M, Maeda S, et al.: Atrial natriuretic peptide inhibits endothelin-1-induced activation of JNK in glomerular mesangial cells. *Kidney Int.* 1998; *53*(5):1133-1142.

- 130** Biesiada E, Razandi M, Levin ER: Egr-1 activates basic fibroblast growth factor transcription. Mechanistic implications for astrocyte proliferation. *J Biol Chem.* 1996; *271(31)*:18576-18581.
- 131** Hu RM, Levin ER: Astrocyte growth is regulated by neuropeptides through Tis8 and basic fibroblast growth factor. *J Clin Invest.* 1994; *93(4)*:1820-1827.
- 132** Anand-Srivastava MB, Srivastava AK, Cantin M: Ring-deleted analogs of atrial natriuretic factor inhibit adenylate cyclase/cAMP system. Possible coupling of clearance atrial natriuretic factor receptors to adenylate cyclase/cAMP signal transduction system. *J Biol Chem.* 1990; *265*:8566-8572.
- 133** Johnson BG, Trachte GJ, Drewett JG: Neuromodulatory effect on the atrial natriuretic factor clearance receptor binding peptide, cANF(4-23)-NH<sub>2</sub> in rabbit isolated vasa deferentia. *J Pharmacol Exp Ther.* 1991; *256*:720-726.
- 134** Maki M, Takayanagi R, Misono KS, et al.: Structure of rat atrial natriuretic factor precursor deduced from cDNA sequence. *Nature.* 1984; *309*:222-224.
- 135** Seidman CE, Duby AD, Choi E: The structure of rat preproatrial natriuretic factor as defined by complementary DNA clone. *Science.* 1984; *225*:324-326.
- 136** Yamanaka M, Greenberg B, Johnson L, et al.: Cloning and sequence analysis of the cDNA for the rat atrial natriuretic factor precursor. *Nature.* 1984; *309*:719-722.
- 137** Zivin RA, Condra JH, Dixon RAF, et al.: Molecular cloning and characterization of DNA sequences encoding rat and human atrial natriuretic factors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1984; *81*:6325-6329.
- 138** Oikawa S, Imai M, Ueno A, et al.: Cloning and sequence analysis of cDNA encoding precursor for human atrial natriuretic polypeptide. *Nature.* 1984; *309*:724-726.
- 139** Voulteenahe O, Arjamaa O, Ling N: Atrial natriuretic polypeptides (ANP): rat atria store high molecular weight precursor but secrete processed peptides of 25-35 amino acids. *Biochem Biophys Res Commun.* 1985; *129*:82-88.
- 140** Day ML, Schwartz D, Wiegand RC, et al.: Ventricular atriopeptin unmasking of messenger RNA and peptide synthesis by hypertrophy or dexamethasone. *Hypertension.* 1987; *9*:485-491.
- 141** Stockmann PT, Will DH, Sides SD, et al.: Reversible induction of right ventricular atriopeptin synthesis in hypertrophy due to hypoxia. *Circ Res.* 1988; *63*:207-213.
- 142** Newman TM, Severs NJ: Arrested exocytosis of atrial secretory granules. *J Mol Cell Cardiol.* 1990; *22*:771-786.
- 143** Gilloteaux J, Jennes L, Menu R, et al.: Ultrastructural immunolocalization of the atrial natriuretic factor pathway in fetal neonatal and adult Syrian hamsters: from the atrial cardiomyocytes in the circulation via the endocardium, atrial capillaries and epicardium. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 1991; *23*:75-91.

- 144 Yan W, Wu F, Morser J, et al.: Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme. *PNAS*. 2000; 97:8525-8529.
- 145 Vesely DL: Atrial natriuretic peptides in pathological diseases. *Cardiovasc Res*. 2001; 51:647-658.
- 146 Vesely DL: Atrial natriuretic peptides in the diagnosis and treatment of congestive heart failure. *CHF*. 1999; 5:171-179,183.
- 147 Vesely DL: Congestive heart failure update: new cardiac peptides in diagnosis and treatment. *Consultant*. 2000; 40:253-263.
- 148 Nemer M, Lavigne JP, Drouin J, et al.: Expression of atrial natriuretic factor gene in heart ventricular tissue. *Peptides*. 1986; 7:1147-1152.
- 149 Ruskoaho H, Thölken H, Lang RE: Increase in atrial pressure releases atrial natriuretic peptide from isolated perfused rat hearts. *Pflugers Arch*. 1986; 407:170-174.
- 150 de Bold AJ, Bruneau BG, Kursoki de Bold ML: Mechanical and neuroendocrine regulation of the endocrine heart. *Cardiovasc Res*. 1996; 31:7-18.
- 151 Laine M, Arjamaa O, Vuolteenaho O, et al.: Block of stretch-activated atrial natriuretic peptide secretion by gadolinium in isolated rat atrium. *J Physiol*. 1994; 480:553-561.
- 152 Laine M, Weckstrom M, Vuolteenaho O, et al.: Effect of ryanodine on atrial natriuretic peptide secretion by contracting quiescent rat atrium. *Pflug Arch Eur J Physiol*. 1994; 426:276-283.
- 153 Katoh S, Toyama J, Aoyama M, et al.: Mechanisms of atrial natriuretic peptide (ANP) secretion by rat hearts perfused in vitro-Ca<sup>2+</sup>(+)-dependent signal transduction for ANP release by mechanical stretch. *Jpn Circ J*. 1990; 54:1283-1294.
- 154 Kuroski-de Bold ML, de Bold AJ: Stretch-secretion coupling in atrial cardiocytes. Dissociation between atrial natriuretic factor release and mechanical activity. *Hypertension*. 18(Suppl.III):169-178.
- 155 McDonough PM, Glembotski CC: Induction of atrial natriuretic factor and myosin light chain-2 gene expression in cultured ventricular myocytes by electrical stimulation of contraction. *J Biol Chem*. 1992; 267:11665-11668.
- 156 Gardner DG, Wirtz H, Dobbs LG: Stretch-dependent regulation of atrial peptide synthesis and secretion in cultured atrial cardiomyocytes. *Am J Physiol*. 1992; 263:E239-E244.
- 157 Ambler SK, Leite MF: Regulation of atrial natriuretic peptide secretion by alpha 1-adrenergic receptors: the role of different second messenger pathways. *J Mol Cell Cardiol*. 1994; 26:391-402.
- 158 Wu SQ, Kwan CY, Tang F: The effect of aging on ANP levels in the plasma, heart, and brain of rats. *J Gerontol Ser A*. 1997; 52:B250-B254.

- 159** Kinnunen P, Vuolteenaho O, Ruskoaho H: Mechanisms of atrial and brain natriuretic peptide release from rat ventricular myocardium: effect of stretching. *Endocrinology*. 1993; *132*:1961-1970.
- 160** Schiebinger RJ, Greening KM: Interaction between stretch and hormonally stimulated atrial natriuretic peptide secretion. *Am J Physiol*. 1992; *262*:H78-H83.
- 161** Skvorak JP, Nazian SJ, Dietz JR: Endothelin acts as a paracrine regulator of stretch-induced atrial natriuretic peptide release. *Am J Physiol*. 1995; *269*:R1093-R1098.
- 162** Skvorak JP, Dietz JR: Endothelin and nitric oxide interact to regulate stretch induced ANP-Secretion. *Am J Physiol*. 1997; *273*:R301-R306.
- 163** Ruskoaho H, Vakkuri O, Arjamaa O, et al.: Pressor hormones regulate atrial-stretch-induced release of atrial natriuretic peptide in the pithed rats. *Circ Res*. 1989; *64*:482-492.
- 164** Thibault G, Doubell AF, Garcia R, et al.: Endothelin-stimulated secretion of natriuretic peptides by rat atrial myocytes is mediated by endothelin A receptors. *Circ Res*. 1994; *74*:460-470.
- 165** Irons CE, Murray SF, Glembotski CC: Identification of the receptor subtype responsible for endothelin-mediated protein kinase C activation and atrial natriuretic factor secretion from atrial myocytes. *J Biol Chem*. 1993; *268*:23417-23421.
- 166** Leite MF, Page E, Ambler SK: Regulation of ANP secretion by endothelin-1 in cultured atrial myocytes: desensitization and receptor subtype. *Am J Physiol*. 1994. *267*:H2193-H2203.
- 167** Schiebinger RJ, Gomez-Sanchez CE: Endothelin: a potent stimulus of atrial natriuretic peptide secretion by superfused rat atria and its dependency on calcium. *Endocrinology*. 1990; *127*:119-125.
- 168** Sei CA, Glembotski CC: Calcium dependence of phenylephrine-, endothelin-, and potassium chloride-stimulated atrial natriuretic factor secretion from long term primary neonatal rat atrial cardiocytes. *J Biol Chem*. 1990; *265*:7166-7172.
- 169** Fukuda Y, Hirata Y, Yoshimi H, et al.: Endothelin is a potent secretagogue for atrial natriuretic peptide in cultured rat atrial myocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988; *155*:167-172.
- 170** Lew RA, Baertschi AJ: Endothelium-dependent ANF secretion in vitro. *Am J Physiol*. 1992; *263*:H1071-H1077.
- 171** Irons CE, Sei CA, Hidaka H, et al.: Proteinkinase C and calmodulin kinase are required for endothelin-stimulated atrial natriuretic factor secretion from primary atrial myocytes. *J Biol Chem*. 1992; *267*:5211-5216.
- 172** Gardner DG, Newman ED, Nakamura KK, et al.: Endothelin increases the synthesis and secretion of atrial natriuretic peptide in neonatal rat cardiocytes. *Am J Physiol*. 1991; *261*:E177-E182.

- 173 Pitkanen M, Mantymaa P, Ruskoaho H: Staurosporine, a protein kinase C inhibitor, inhibits atrial natriuretic peptide secretion induced by sarafotoxin, endothelin and phorbol ester. *Eur J Pharmacol.* 1991; *195*:307-315.
- 174 Schiebinger RJ, Parr HG, Cragoe EJ Jr: Calcium: its role in alpha 1-adrenergic stimulation of atrial natriuretic peptide secretion. *Endocrinology.* 1992; *130*:1017-1023.
- 175 Lachance D, Garcia R, Gutkowska J, et al.: Mechanisms of release of atrial natriuretic factor. I. Effect of several agonists and steroids on its release by atrial minces. *Biochem Biophys Res Commun.* 1986; *135*:1090-1098.
- 176 Van de Bent V, Church DJ, Vallotton MB, et al.:  $[Ca^{2+}]_i$  and protein kinase C in vasopressin-induced prostacyclin and ANP release in rat cardiomyocytes. *Am J Physiol.* 1994; *266*:H597-H605.
- 177 Matsubara H, Hirata Y, Yoshimi H, et al. Role of calcium and protein kinase C in ANP secretion by cultured rat cardiocytes. *Am J Physiol.* 1988; *255*:H504-H509.
- 178 Soualmia H, Barthelemy C, Masson F, et al.: Angiotensin II-induced phosphoinositide production and atrial natriuretic peptide release in rat atrial tissue. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1997; *29*:605-611.
- 179 Soualmia H, Masson F, Barthelemy C, et al.: Cellular mechanism of angiotensin II-induced atrial natriuretic peptide release in rat right atrial tissue. *Life Sci.* 1996; *58*:1621-1629.
- 180 Shubeita HE, Martinson EA, Van Bilsen M, et al.: Transcriptional activation of the cardiac myosin light chain 2 and atrial natriuretic factor genes by protein kinase C in neonatal rat ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; *89*:1305-1309.
- 181 Bogoyevitch MA, Glennon PE, Sugden PH: Endothelin-1, phorbol esters and phenylephrine stimulate MAP kinase activity in ventricular cardiomyocytes. *FEBS Lett.* 1993; *317*:271-275.
- 182 Zongazo MA, Carayon MA, Masson F, et al.: Effects of arginine vasopressin and extracellular osmolarity on atrial natriuretic peptide release by superfused rat atria. *Eur J Pharmacol.* 1991; *209*:45-55.
- 183 Azizi C, Carayon A, Masson F, et al.: Mechanisms of isoproterenol-induced atrial natriuretic peptide release from superfused rabbit atria. *Am J Physiol.* 1993; *265*:H1283-H1288.
- 184 Church DJ, Van der Bent V, Vallotton MB, et al.: Role of prostaglandin-mediated cyclic AMP formation in protein kinase C-dependent secretion of atrial natriuretic peptide in rat cardiomyocytes. *Biochem J.* 1994; *303*:217-225.
- 185 Leskinen H, Vuolteenaho O, Leppaluoto J, et al.: Role of nitric oxide on cardiac hormone secretion: Effect of N(G)-Nitro-L-arginine methyl ester on atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide release. *Endocrinology.* 1995; *136*:1241-1249.

- 186** Melo LG, Sonnenberg H: Effect of nitric oxide inhibition on secretion of atrial natriuretic factor in isolated rat heart. *Am J Physiol.* 1996; *270*:H306-H311.
- 187** Sato A, Canny BJ, Autelitano DJ: Adrenomedullin stimulates cAMP accumulation and inhibits atrial natriuretic peptide gene expression in cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; *230*:311-314.
- 188** Winters CJ, Sallman AL, Baker BJ, et al.: The N-terminus and a 4000 molecular weight peptide from the mid portion of the N-terminus of the atrial natriuretic factor prohormone each circulate in humans and increase in congestive heart failure. *Circulation.* 1989; *80*:438-449.
- 189** Daggubati S, Parks JR, Overton RM, et al.: Adrenomedullin, endothelin, neuropeptide Y., atrial, brain, and C-natriuretic prohormone peptides compared as early heart failure indicators. *Cardiovasc Res.* 1997; *36*:246-255.
- 190** Hall C, Rouleau JL, Moya L, et al.: N-terminal proatrial natriuretic factor. An independent predictor of long-term prognosis after myocardial infarction. *Circulation.* 1994; *89*:1934-1942.
- 191** Lerman A, Gibbons RJ, Rodeheffer, et al.: Circulating N-terminal atrial natriuretic peptide as a marker for symptomless left-ventricular dysfunction. *Lancet.* 1993; *341*:1105-1109.
- 192** Ruskoaho H: Cardiac hormones as diagnostic tools in heart failure. *Endocrine Reviews.* 2003; *24*:341-356.
- 193** Morita H, Tanaka I, Oda T, et al.: Atrial natriuretic peptide messenger RNA and peptide in rats with aortic valve insufficiency. *Peptides.* 1990; *11(4)*:843-847.
- 194** Cantin M, Thibault G, Ding JF, et al.: ANF in experimental congestive heart failure. *Am J Pathol.* 1988; *130*:552-568.
- 195** Wong NL, Wong EF, Hu DC: Atrial natriuretic factor release in cardiomyopathic hamsters. *Cardiology.* 1992; *80*:12-17.
- 196** Tsuchimochi H, Yazaki Y, Ohno H, et al.: Ventricular expression of atrial natriuretic peptide. *Lancet.* 1987; *2*:336-337.
- 197** Thibault G, Nemer M, Drouin J, et al.: Ventricles as a major site of atrial natriuretic factor synthesis and release in cardiomyopathic hamster with heart failure. *Circ Res.* 1989; *65*:71-82.
- 198** Takahashi T, Allen PD, Izumo S: Expression of A-, B-, C-type natriuretic peptide genes in failing and developing human ventricles: correlation with expression of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase gene. *Circ Res.* 1992; *71*:9-17.
- 199** Feldman AM, Ray PE, Silan CM, et al.: Selective gene expression in failing human heart. *Circulation.* 1991; *83*:1866-1872.

- 200** Saito Y, Nakao K, Arai H, et al.: Augmented expression of atrial natriuretic polypeptide gene in ventricle of human failing heart. *J Clin Invest.* 1989; *83*:298-305.
- 201** Biollaz J, Callahan LT, Nussberger J, et al.: Pharmacokinetics of synthetic atrial natriuretic peptides in normal men. *Clin Pharmacol Ther.* 1987; *41*:671-677.
- 202** Charles CJ, Espiner EA, Nicholls MG, et al.: Clearance receptors and endopeptidase 24.11: equal role in natriuretic peptide metabolism in conscious sheep. *Am J Physiol.* 1996; *271*:R373-R380.
- 203** Garcia R, Diebold S: Simple, rapid, and effective method of producing aortocaval shunts in the rat. *Cardiovasc Res.* 1990; *24*:430-432.
- 204** Langenickel T, Pagel I, Buttgereit J, et al.: Rat corin gene: Molecular cloning and reduced expression in experimental heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004; *287*(4):H1516-H1521.
- 205** Redfield MM, Edwards BS, McGoon MD, et al.: Failure of atrial natriuretic factor to increase with volume expansion in acute and chronic congestive heart failure in the dog. *Circulation.* 1989; *80*(3):651-657.
- 206** Tomanek RJ, Torry RJ: Growth of the coronary vasculature in hypertrophy: mechanisms and model dependence. *Cell Mol Biol Res.* 1994; *40*:129-136.
- 207** Scriven TA, Burnett Jr JC: Effects of synthetic atrial natriuretic peptide on renal function and renin release in acute experimental heart failure. *Circulation.* 1985; *72*:892-897.
- 208** Cody RJ, Atlas SA, Laragh JH, et al.: Atrial natriuretic factor in normal subjects and heart failure patients: plasma levels and renal hormonal, and hemodynamic responses to peptide infusion. *J Clin Invest.* 1986; *78*:1362-1374.
- 209** Potter LR, Garbers DL: Protein kinase C-dependent desensitization of the atrial natriuretic peptide receptor is mediated by dephosphorylation. *J Biol Chem.* 1994; *269*:14636-14642.
- 210** Volpe M, Tritto C, DeLuca N, et al.: Failure of Atrial Natriuretic Factor to Increase with Saline Load in Patients with Dilated Cardiomyopathy and Mild Heart Failure. *J Clin Invest.* 1991; *88*:1481-1489.
- 211** Volpe M, Tritto C, DeLuca N, et al.: Angiotensin converting enzyme inhibition restores cardiac and hormonal responses to volume overload in patients with dilated cardiomyopathy and mild heart failure. *Circulation.* 1992; *86*(6):1800-1809.
- 212** Sata N, Tanaka Y, Suzuki S, et al.: Effectiveness of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor or Angiotensin II Receptor Blocker on Atrial Natriuretic Peptide. *Circ J.* 2003; *67*:1053-1058.
- 213** Tran KL, Lu X, Lei M, et al.: Up-regulation of Corin Gene Expression in Hypertrophic Cardiomyocytes and Failing Myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004; *287*(4):H1625-H1631.

- 214** Drexler H, Hanze J, Finckh M, et al.: Atrial natriuretic peptide in a rat model of cardiac failure. Atrial and ventricular mRNA, atrial content, plasma levels, and effect of volume loading. *Circulation*. 1989; *79(3)*:620-633.
- 215** Mendez RE, Pfeffer JM, Ortola FV, et al.: Atrial natriuretic peptide transcription, storage, and release in rats with myocardial infarction. *Am J Physiol*. 1987; *253(6Pt2)*:H1449-H1455.
- 216** Linzbach AJ: Heart failure from the point of view of quantitative anatomy. *Am J Cardiol*. 1960; *5*:370-382.
- 217** Fujiwara T, Fujiwara H, Takemura G, et al.: Expression and distribution of atrial natriuretic polypeptide in the ventricles of children with myocarditis and/or myocardial infarction secondary to Kawasaki disease: immunohistochemical study. *Am Heart J*. 1990; *120*:612-618.
- 218** Takemura G, Fujiwara H, Mukoyama M, et al.: Expression and distribution of atrial natriuretic peptide in human hypertrophic ventricle of hypertensive hearts and hearts with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 1991; *83*:181-190.
- 219** Currie MG, Oehlenschlager WF, Kurtz DT: Profound elevation of ventricular and pulmonary atriopeptin in a model of heart failure. *Biochem Biophys Res Commun*. 1987; *148(3)*:1158-1164.
- 220** Edwards BS, Ackermann DM, Lee M, et al.: Identification of atrial natriuretic factor within ventricular tissue in hamsters and humans with congestive heart failure. *J Clin Invest*. 1988; *81*:82-87.
- 221** Franch HA, Dixon RA, Blaine EH, et al.: Ventricular atrial natriuretic factor in the cardiomyopathic hamster model of congestive heart failure. *Circ Res*. 1988; *62*:31-36.
- 222** Tune JD, Richmond KN, Gorman MW, et al.: Control of coronary blood flow during exercise. *Exp Biol Med*. 2002; *227(4)*:238-250.
- 223** Larsen TH, Myking O, Lillehaug Jr, et al.: Inhibition and downregulation of protein kinase C in cultured atrial myocytes: effects on distribution of specific granules and secretion of atrial natriuretic peptide. *Mol Cell Endocrinol*. 1993; *94*:173-81.
- 224** Rodriguez-Pena A, Rozengurt E: Disappearance of Ca<sup>2+</sup>-sensitive, phospholipid-dependent protein kinase activity in phorbol ester-treated 3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984; *120(3)*:1053-1059.
- 225** Ballester R, Rosen OM: Fate of immunoprecipitable protein kinase C in GH3 cells treated with phorbol 12-myristate 13-acetate. *J Biol Chem*. 1985; *260(28)*:15194-15199.
- 226** Hepler JR, Earp HS, Harden TK: Long-term phorbol ester treatment downregulates protein kinase C and sensitizes the phosphoinositide signaling pathway to hormone and growth factor stimulation. Evidence for a role of protein kinase C in agonist induced desensitization. *J Biol Chem*. 1982; *63(16)*:7610-7619.

- 227** Pfeilschifter J, Ochsner M, Whitebread S, et al.: Down-regulation of protein kinase C potentiates angiotensin II-stimulated polyphosphoinositide hydrolysis in vascular smooth-muscle cells. *Biochem J.* 1989; *262(1)*:285-291.
- 228** Kumar R, Cartledge WA, Lincoln TM, et al.: Expression of guanylyl cyclase-A/atrial natriuretic peptide receptor blocks the activation of protein kinase C in vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* 1997; *29(part 2)*:414-421.
- 229** Uusimaa P, Ruskoaho H, Leppaluoto J, et al.: Cytosolic Ca<sup>2+</sup> during atrial natriuretic peptide secretion from cultured neonatal cardiomyocytes. *Mol Cell Endocrinol.* 1990; *73*:253-263.
- 230** Ruskoaho H, Toth M, Ganten D, et al.: The phorbol ester induced atrial natriuretic peptide secretion is stimulated by forskolin and BAY K8644 and inhibited by 8-bromocyclicGMP. *Biochem Biophys Res Commun.* 1986; *139(1)*:266-274.
- 231** Ruskoaho H, Vuolteenaho O, Leppälüoto J: Phorbol esters enhance stretch-induced atrial natriuretic peptide secretion. *Endocrinology.* 1990; *127*:2445-2455.
- 232** Leskinen H, Vuolteenaho O, Toth M, et al.: Atrial natriuretic peptide (ANP) inhibits its own secretion via ANP<sub>A</sub> receptors: altered effect in experimental hypertension. *Endocrinology.* 1997; *138(5)*:1893-1902.
- 233** van Bibber R, Traub O, Kroll K, et al.: EDRF and norepinephrine-induced vasodilation in the canine coronary circulation. *Am J Physiol.* 1995; *268(Heart Circ Physiol 37)*:H1973-H1981.
- 234** Hirata K-I, Kuroda R, Sakoda T, et al.: Inhibition of endothelial nitric oxide synthase activity by protein kinase C. *Hypertension.* 1995; *25*:180-185.
- 235** Church DJ, Braconi S, Van der Bent V, et al.: Protein kinase C-dependent prostaglandin production mediates angiotensin II-induced atrial-natriuretic peptide release. *Biochem J.* 1994; *298*:451-456.
- 236** Ruskoaho H: Atrial Natriuretic Peptide: Synthesis, Release, and Metabolism. *Pharmacological Reviews.* 1992; *44(4)*:479-602.
- 237** Willenbrock R, Scheuermann M, Thibault G, et al.: Angiotensin inhibition and atrial natriuretic peptide release after acute volume expansion in rats with aortocaval shunt. *Cardiovasc Res.* 1999; *42*:733-742.
- 238** Qing G, Garcia R: Characterization of plasma and tissue atrial natriuretic factor during development of moderate high output heart failure in the rat. *Cardiovasc Res.* 1993; *27*:464-470.
- 239** Garcia R, Lachance D, Thibault G: Atrial natriuretic factor release and natriuresis in rats with high-output heart failure. *Am J Physiol.* 1990; *259(5Pt2)*:H1374-H1379.

- 240** Langenickel T, Pagel I, Höhnel K, et al.: Differential regulation of cardiac ANP and BNP mRNA in different stages of experimental heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;278:H1500-H1506.
- 241** Brown LA, Nunez D, Wilkins MR: Differential Regulation of Natriuretic Peptide Receptor Messenger RNAs during the Development of Cardiac Hypertrophy in the Rat. *J Clin Invest.* 1993; 92:2702-2712.
- 242** Forssmann WG, Richter R, Meyer M: The endocrine heart and natriuretic peptides: histochemistry cell biology, and functional aspects of the renal urodilatin system. *Histochem Cell Biol.* 1998; 110:335-357.
- 243** Zink R, Heiny o, Steiert H: Bedienungsanleitung zur Apparatur isoliertes Herz Größe 3, Typ 830, Version 1.0. 1994; 16.

## **7. DANKSAGUNG**

Großer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Willenbrock sowie meiner Betreuerin Frau Dr. Pagel. Durch ihre stetige Betreuung und Anleitung konnte ich sehr viel über das wissenschaftliche Arbeiten sowie über die Zusammenarbeit in der Arbeitsgruppe lernen.

Bei der statistischen Auswertung der Versuche hat mich Frau Dr. Wegner vom Institut für Medizinische Biometrie (DRK Klinik Westend) unterstützt, wofür ich mich an dieser Stelle ganz herzlich bedanken möchte.

Ein großes Dankeschön geht auch an meine liebe Freundin Maren Wanke, die mir bei der graphischen Darstellung der Methodik sehr geholfen hat.

Frau Günzel führte die Radioimmunoassays zur Bestimmung der ANP-Konzentration im Perfusat durch. Dafür und für ihre immer freundliche Art möchte ich mich hiermit bedanken.

Während der Arbeit waren mir die vielen Tipps und Tricks von Frau Schiche und Frau Meisel, die als medizinisch technische Assistentinnen in unserem Labor arbeiten, eine große Unterstützung.

Meine Familie und meine Freunde haben mich während der nicht immer einfachen Zeit der Promotion unentwegt aufgemuntert und seelisch an allen Hochs und Tiefs des Werdeganges teilgenommen. Das hat mir sehr viel Kraft und Energie gegeben, ohne die diese Doktorarbeit nicht hätte entstehen können.

## **8. ERKLÄRUNG AN EIDES STATT**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertation selbstständig und nur mit den in der Arbeit angegebenen Hilfsmitteln und der vollständig aufgelisteten Literatur sowie der in der Danksagung erwähnten Unterstützung durchgeführt habe. Sie stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar.

Berlin den 10. Dezember 2004

Angela Nikola Model

## 9. LEBENS LAUF

Name: Angela Nikola Model  
Geburtsdatum: 13.01.1978  
Geburtsort: Berlin  
Familienstand: ledig  
Kinder: keine  
Nationalität: deutsch

### Studium:

November 2004 3. Staatsexamen  
2003-2004 Praktisches Jahr  
1. Tertial: *Chirurgie*: Hospital General Calixto García  
La Habana, Cuba  
2. Tertial: *Gynäkologie*: 1. Teil: Hospital Civil de Guadalajara, Mexico  
2. Teil: Charité Campus Virchowklinikum, Berlin  
3. Tertial: *Innere Medizin*: Krankenhaus Hennigsdorf  
August 2003 2. Staatsexamen  
SS 01 Studium am Karolinska Institut in Stockholm, Schweden  
WS 00/01 Forschungssemester  
zur Durchführung des experimentellen Teils der Promotion  
2000 1. Staatsexamen  
1999 Physikum  
WS 97/98 Studienbeginn der Humanmedizin an der Humboldt-Universität zu Berlin

### Schulbildung:

1997 Abitur am Rosa-Luxemburg-Gymnasium in Berlin  
1994-1995 Graduation an der Juab High School in Nephi (Utah, USA)

Berlin, den 10. Dezember 2004

Angela Nikola Model