

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN II
DIREKTOR: PROF. DR. MED. G. A. J. RIEGGER
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**SALZINDUZIerte KARDIALE UMBAUvORGÄNGE
BEIM METABOLISCHEN SYNDROM
- EINFLUSS EINER THERAPIE MIT EPLERENON**



**Inaugural–Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

der
**Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg**

vorgelegt von

Sabine Brunner

2011

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN II
DIREKTOR: PROF. DR. MED. G. A. J. RIEGGER
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**SALZINDUZIerte KARDIALE UMBAUvORGÄNGE
BEIM METABOLISCHEN SYNDROM
- EINFLUSS EINER THERAPIE MIT EPLERENON**



**Inaugural–Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg**

vorgelegt von

Sabine Brunner

2011

Dekan:	Prof. Dr. Bernhard Weber
1. Berichterstatter	PD Dr. Dierk Endemann
2. Berichterstatter	Prof. Dr. Michael Hilker
Tag der mündlichen Prüfung:	23.01.2012

Meiner Mutter Edeltraud und meinem Vater Hans

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen und chemische Formeln	I
Liste der verwendeten Chemikalien und Substanzen	IV
Antikörper	VI
Primer	VI
Geräte	VII
Verbrauchsmaterialien	VIII
Software	VIII
1 Einleitung	- 1 -
2 Material und Methoden	- 7 -
2.1 Das Tiermodell	- 7 -
2.2 Gruppenzusammensetzung	- 8 -
2.3 Tierhaltung	- 8 -
2.4 Fütterung	- 9 -
2.5 Behandlung der Tiere	- 11 -
2.5.1 Eplerenon	- 11 -
2.5.2 Hydralazin	- 11 -
2.6 Verlaufparameter	- 12 -
2.6.1 Körpergewicht	- 12 -
2.6.2 Blutzucker	- 12 -
2.6.3 Blutdruck und Herzfrequenz	- 12 -
2.6.4 Belastungstest	- 13 -
2.6.5 Herzechokardiographie	- 14 -
2.7 Versuchsende	- 14 -
2.8 Versuchsablauf	- 15 -
2.9 Bestimmung der ANP-/BNP-Genexpression im linken Ventrikel	- 16 -
2.9.1 RNA-Extraktion	- 16 -
2.9.2 Reverse Transkription	- 16 -
2.9.3 Taqman-PCR	- 17 -
2.9.3.1 Grundlagen	- 17 -
2.9.3.2 Durchführung	- 18 -
2.10 Bestimmung der ANP-/BNP-Proteinmenge im linken Ventrikel	- 19 -
2.10.1 Proteinextraktion aus Gewebe	- 19 -
2.10.2 Bestimmung der Gesamtproteinmenge	- 20 -
2.10.3 RIA	- 20 -
2.10.3.1 Prinzip	- 20 -
2.10.3.2 Ablauf	- 21 -
2.11 Histologische Untersuchungen	- 24 -
2.11.1 Hämalaun-Eosin-Färbung	- 24 -
2.11.2 Sirius-Red-Färbung	- 25 -
2.11.3 Immunhistochemie auf Laminin	- 25 -
2.12 Analysen aus dem Blutserum	- 26 -
2.13 Statistische Analysen	- 26 -
3 Ergebnisse	- 27 -
3.1 Stammdaten	- 27 -
3.1.1 Körpergewicht	- 27 -
3.1.2 Herzgewicht	- 28 -

Inhaltsverzeichnis

3.1.3	Blutzucker	- 29 -
3.1.4	Blutdruck	- 31 -
3.1.5	Laufband	- 35 -
3.2	Echokardiographie	- 36 -
3.2.1	Linksventrikulärer innerer diastolischer Diameter	- 36 -
3.2.2	Diastolische Septumdicke	- 37 -
3.2.3	Fractional Shortening	- 38 -
3.3	Linksventrikulärer Fibrosegrad	- 39 -
3.4	Kardiomyozyten-Durchmesser	- 40 -
3.5	Analysen im Blutserum	- 41 -
3.6	RIA	- 43 -
3.6.1	ANP im linken Ventrikel	- 43 -
3.6.2	BNP im linken Ventrikel	- 44 -
3.7	Taqman-PCR	- 45 -
3.7.1	ANP-mRNA im linken Ventrikel	- 45 -
3.7.2	BNP-mRNA im linken Ventrikel	- 46 -
4	Diskussion	- 47 -
5	Zusammenfassung	- 62 -
6	Ausblick	- 64 -
7	Quellenverzeichnis	- 65 -
8	Veröffentlichungen	- 74 -
9	Danksagung	- 75 -
10	Lebenslauf	- 76 -

Abkürzungen und chemische Formeln

μCi	MikroCurie
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
AK	Antikörper
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
ARBs	Angiotensin-Rezeptor-Blocker
AT-1	Angiotensin-1
AT-2	Angiotensin-2
AUC	Area under the curve
BAS	Bicinchoninic Acid Solution
BNP	Brain Natriuretic Peptide
bp	Basenpaare
BZ	Blutzucker
C	Celsius
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	Complementary DNA
cm	Zentimeter
DAB	Diaminobenzidin
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FS	Fractional Shortening
g	Gramm
GAR	Goat anti-rabbit IgG serum
GCA-KO	Guanylat-cyclase-A-knock-out-Mäuse
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Chlorwasserstoff

Abkürzungen und chemische Formeln

HDL	High density lipoprotein
HRP	Horseradish Peroxidase
I	Jod
IgG	Immunglobulin G
IVSd	Interventricularseptum diastolisch
IVSs	Interventricularseptum systolisch
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LDL	Low density lipoprotein
LV	Linker Ventrikel
LVH	Linksventrikuläre Hypertrophie
LVIDd	Left Ventricular Internal Diameter diastolisch
LVIDs	Left Ventricular Internal Diameter systolisch
LVPWd	Left Ventricular Posterior Wall Diameter diastolisch
LVPWs	Left Ventricular Posterior Wall Diameter systolisch
LW	Lebenswoche
m	Meter
mg	Milligramm
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
Mhz	Megahertz
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mM	Millimolar
M-MLV RT	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
mmol	Millimol
MW	Mittelwert
mRNA	Messenger RNA
NaCl	Kochsalz
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NIDDM	Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus

Abkürzungen und chemische Formeln

nm	Nanometer
Nr	Nummer
NRS	Normal rabbit serum
NSB	Non-specific binding
NSS	Normales Schweine-Serum
PBS	Gepufferter Phosphatpuffer (Phosphate Buffered Saline)
PCR	Polymerase Chain Reaction
pg	Picrogramm
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RR	Blutdruck, gemessen nach Riva Rocci
RT	Reverse Transkriptase
sec	Sekunde
SEM	Standard Error of the Mean
SHRSP	Stroke-prone spontaneously hypertensive rats
Std.abw.	Standardabweichung
SV	Schlagvolumen
TB	Total binding
TC	Total counts
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
VLDL	Very low density lipoprotein
WHO	World Health Organisation
ZDF-Ratte	Zucker Diabetic Fatty rat
ZDL-Ratte	Zucker Diabetic Lean rat (heterozygotes Kontrolltier)
ZF-Ratte	Zucker Fatty rat

Liste der verwendeten Chemikalien und Substanzen

ABC-Kit-Standard	Linaris, Wertheim-Bettingen, Germany
Aceton	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany
Ag-Unmasking-Solution	Linaris, Wertheim-Bettingen, Germany
ANP RIA Kit	Phoenix Pharmaceuticals Inc. Europe, Karlsruhe, Germany
Aqua ad iniectabilia	Braun, Melsungen, Germany
Avidin-Biotin-Blocking-Kit	Linaris, Wertheim-Bettingen, Germany
BAS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany
BNP-32 RIA Kit	Phoenix Pharmaceuticals Inc. Europe, Karlsruhe, Germany
CaCl ₂	Merck, Darmstadt, Germany
DAB Liquid Substrate System Tetrahydrochloride	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany
Depex	Serva, Heidelberg, Germany
D-Glucose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany
dNTP-Solution	Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden
EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany
Eosin G-Lösung 0,5%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany
Eplerenone	Pharmacia & Upjohn Co. A Division of Pfizer, Inc. Kalamazoo, MI, USA
Essigsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany
Fast Green FCF	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany
H ₂ O ₂	Merck, Darmstadt, Germany
HCl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany
Hydralazin hydrochloride	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany
Kaleidoscope Prestained Standards	BioRad Laboratories Inc., Isman, Germany
KCl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany
Ketamin 10%	Wirtschaftsgemeinschaft deutscher Tierärzte (WDT), Garbsen, Germany
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt, Germany
Kupfer(II)-Sulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany

Chemikalien und Substanzen

Mayers Hämalan	Merck, Darmstadt, Germany
Methylgrün	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Switzerland
MgSO ₄	Sigma, Taufkirchen, Germany
M-MLV RT	Promega, Mannheim, Germany
M-MLV RT 5x Puffer	Promega, Mannheim, Germany
NaCl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany
NaHCO ₃ -	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany
NSS	Dako, Glostrup, Denmark
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, Germany
PBS	Biochrom AG, Berlin, Germany
PIC	BD Biosciences GmbH, Heidelberg, Germany
Picrinsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany
PMSF	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany
Proteinase K	Qiagen, Hilden, Germany
Protein-Standard	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany
Random Primers	Promega, Mannheim, Germany
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden, Germany
RNasin Ribonuclease Inhibitor	Promega, Mannheim, Germany
RNeasy midi Kit	Qiagen, Hilden, Germany
Roti-Plast Paraffin-Pastillen	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany
Sirius Red Reagens (= Direkt Rot 80)	Sigma, Taufkirchen, Germany
Stickstoff, flüssig	Linde Gas, Pullach, Germany
Sucrose	Sigma, Taufkirchen, Germany
Taq DNA Polymerase	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany
Taqman Gene Expression Assay	Applied Biosystems Inc., Foster City, California, USA
TRIS	USB Corporation, Cleveland, USA
Tween-20	Merck, Darmstadt, Germany
Xylazin 2%	Serumwerk Bernburg, Bernburg, Germany
Xylol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany

Antikörper und Primer

Antikörper

Goat-anti-rabbit-AK/HRP (2. AK Laminin)	Dako, Glostrup, Denmark, Nr. P 0448
Goat-anti-Type I-Collagen-AK	Oxford Biotechnology, Oxfordshire, UK, Nr. 1310-01
Laminin 1+2-AK rabbit polyclonal (1.AK Laminin)	Abcam, Cambridge, UK, Nr. ab 7463
Polyclonal Swine Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP	Dako, Glostrup, Denmark, Nr. P 0399
Polyclonal-rabbit-anti-goat-IgG/HRP	Dako, Glostrup, Denmark, Nr. P 0160

Primer

Assay ID	Gene Name	Context Sequence	NCBI Gene Reference
Rn00567508_m1	Calsequestrin-2	TGCCAAGAGGCTGGGCTTCAGTGAA	NM_017131.2
Rn00580641_m1	Natriuretic Peptide Precursor Type B	GGGCTGTGACGGGCTGAGGTTGTTT	NM_031545.1
Rn00561661_m1	Natriuretic Peptide Precursor Type A	AACAGCTTCCGGTACCGAAGATAAC	NM_012612.1

Geräte

Geräte

Autoclav	Technomara, Fernwald, Germany
Blutdruck-Messgerät	TSE Technical & Scientific Equipment GmbH, Bad Homburg, Germany
BZ-Messgerät	Accu-Check Plus Roche, Mannheim, Germany
Durchlichtmikroskop	Leitz, Wetzlar, Germany
E max precision microplate Reader	MWG Biotech, Ebersberg, Germany
Fotokamera	Nikon, Düsseldorf, Germany
Gamma Counter	Cobra II, Packard, Palo Alto, California, USA
Heizblock	Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg, Germany
Homogenisator	IKA Labortechnik GmbH, Staufen, Germany
Kryostat CM 30505	Leica Microsystems GmbH, Nussloch, Germany
Laufband	Eigenbau Universität Regensburg
Metabolische Käfige	Eigenbau Universität Regensburg
Multipipette	Eppendorf, Hamburg, Germany
Paraffin-Mikrotom	
➤ Kühlplatte CP60	Microm, Thermo Scientific, Walldorf, Germany
➤ Schlittenmikrotom HM 400	Microm, Thermo Scientific, Walldorf, Germany
➤ Wasserbad	GFL, Burgwedel, Germany
pH-Meter	Mettler-Toledo, Schwerzenbach, Switzerland
Photometer	Biochrom, Cambridge, UK
Pipetten (10/20/100/200/1000µl)	Eppendorf, Hamburg, Germany
Präzisionswaage	Sartorius, Göttingen, Germany
Taqman	Applied Biosystems, Foster City, USA
Ultraschallgerät	Hewlett Packard Sonos 5500 device with a 12.5 MHz transducer
Vortexer	REAX 2000, Heidolph, Germany
Waage	Sartorius, Göttingen, Germany
Wasseraufbereitungsanlage	Millipore, Eschborn, Germany
Wasserbad	Lauda, Königshofen, Germany
Wasserstrahlpumpe	Eigenbau Universität Regensburg
Zentrifugen	Heraeus, Nürnberg, Germany

Verbrauchsmaterialien

Eppendorf-Cups	Eppendorf, Hamburg, Germany
Glasobjektträger	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany
Serum-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Germany
EDTA-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Germany
Urin-Teststreifen Combur	Roche, Mannheim, Germany
PCR Tubes und Platten	Sarstedt, Nümbrecht, Germany
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Germany
Falcon Tubes	BD Biosciences GmbH, Heidelberg, Germany
384 Well Mikrotiterplatte	Eppendorf, Hamburg, Germany

Software

Metavue	Molecular Devices GmbH, München, Germany
Softmax	Molecular Devices GmbH, München, Germany
GraphPad Prism 5.0	GraphPad Software, La Jolla, California, USA

1 Einleitung

Das von Gerald Reaven bereits 1988 erstmals als *Syndrom X* beschriebene metabolische Syndrom liegt laut der Kriterien der Weltgesundheitsorganisation (WHO) von 1999 dann vor, wenn folgende Risikofaktoren bestehen: Diabetes mellitus, gestörte Glucosetoleranz und pathologischer Nüchternblutzucker bzw. Insulinresistenz sowie zwei der folgenden Parameter: arterielle Hypertonie, Dyslipidämie oder viszerale Adipositas [1-4].

Einer der limitierenden Faktoren hierbei ist sicherlich der sich entwickelnde manifeste Diabetes mellitus Typ 2 mit den daraus resultierenden Komplikationen: koronare Herzkrankheit, Apoplex, periphere arterielle Verschlusskrankheit, Nephropathie und Retinopathie, sowie Neuropathie und Kardiomyopathie [5,6]. Bereits in den siebziger Jahren konnte ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Diabetes mellitus und kardiovaskulärer Mortalität gefunden werden [7-9]. In ungefähr 65% werden kardiovaskuläre Erkrankungen als Todesursachen bei Diabetikern angegeben [10]. Schon 1972 postulierten Rubler et al. das Vorhandensein einer bis dato noch nicht vorbeschriebenen Kardiomyopathie, die mit einer diabetischen Glomerulopathie (Mikroangiopathie) assoziiert ist und nicht auf Koronararteriosklerose, Hypertonie oder andere kardiale Grunderkrankungen zurückgeführt werden konnte [11]. Der genaue Mechanismus dieser diabetischen Kardiomyopathie ist jedoch bis heute noch nicht endgültig geklärt und deshalb Gegenstand zahlreicher Forschungsprojekte.

Die früheste, klinisch meist noch asymptomatische Manifestation der diabetischen Kardiomyopathie besteht in einer diastolischen Dysfunktion. Diese ist charakterisiert durch reduzierte frühdiastolische Füllung, Verlängerung der isovolumetrischen Relaxationszeit und durch einen erhöhten atrialen Füllungsdruck [12]. Als mögliche Ursachen wurden metabolische Störungen, myokardiale Fibrosierung, koronare Mikroangiopathie, kardiale autonome Neuropathie und Insulinresistenz genannt [13].

Diese bei nicht-insulinpflichtigem Diabetes mellitus (NIDDM) relativ frühzeitig nachweisbare diastolische Dysfunktion wird in der Literatur mit 30 bis 60% angegeben [14-16].

Einleitung

Eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der kardialen Problematik scheint im Zusammenhang mit dem Diabetes mellitus der gleichzeitig bestehende Hyperaldosteronismus zu spielen. Die Prävalenz von primärem Hyperaldosteronismus bei diabetischen Patienten mit resistentem Hypertonus wird nach neuesten Erkenntnissen mit ca. 14% angegeben [17, 18].

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) ist ein endokrines System zur Regulation des Salz- und Wasserhaushaltes und des systemischen Blutdrucks. Das in der Leber produzierte Peptid Angiotensinogen wird von Renin, das im juxtaglomerulären Apparat der Nieren freigesetzt wird, zu Angiotensin I gespalten. Angiotensin I wird dann durch das Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE), das hauptsächlich auf der Oberfläche pulmonaler Endothelzellen exprimiert wird, zu Angiotensin II aktiviert. Angiotensin II bewirkt eine Vasokonstriktion über Interaktion an spezifischen Rezeptoren glatter Gefäßmuskelzellen und stimuliert die Freisetzung von Aldosteron in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde [19].

Als Bestandteil des RAAS beeinflusst Aldosteron den transepithelialen Transport von Natrium, Kalium und Wasser am distalen Tubulus [20, 21]. Aldosteron-Rezeptoren sind aber auch in anderen Geweben nachweisbar: Bei Aldosteron-Exposition von Kardiomyozyten in vitro zeigte sich eine Aktivierung des Natrium-Kalium-Chlorid-Cotransporters. Dies führt zu einem vermehrten Natrium-Einstrom in die Zelle und konsekutiv zu einem erhöhten Zellvolumen [22]. Zusätzlich erfolgt eine Aldosteron-abhängige Aktivierung und Rekrutierung des Cotransporters in Fibroblasten, was zu einer Fibroblastenstimulation führt. Dies wird als möglicher Mechanismus einer damit einhergehenden perivaskulären Fibrosierung im Myokard gesehen [23].

Vor allem in Kombination mit Hochsalzdiät induziert Aldosteron eine Leukozyteninfiltration und eine Schädigung der Koronararterien mit assoziierter Ischämie und Nekrose des angrenzenden Myokards. Weiterhin führt es zu verstärkter Expression proinflammatorischer Botenstoffe. Auf diese Weise induziert Aldosteron eine vaskuläre Entzündungsreaktion und trägt so zum Endorganschaden bei [24, 25].

In den neunziger Jahren fanden sich Hinweise darauf, dass chronisch erhöhte Aldosteron-Spiegel zu einer fassbaren Fibrosierung sowohl im rechten und linken Ventrikel [26-28] als auch in den beiden Vorhöfen [29] führt. Verstärkt werden diese

Einleitung

Effekte durch das Vorhandensein eines kompletten Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems auf Gewebe-Ebene [30].

Zusammenfassend vermittelt das Hormon Aldosteron Natriumretention, Magnesium- und Kaliumverlust, Hemmung des Parasympathikus, Barorezeptor-Dysfunktion sowie eine vaskuläre Schädigung und beeinträchtigt die arterielle Compliance [31, 32].

Dem profibrotischen Effekt versuchte man zunächst, mit Hilfe von ACE-Inhibitoren entgegenzuwirken. Sowohl in Tierversuchen als auch in klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass diese nicht nur blutdrucksenkende Effekte aufweisen, sondern auch einen günstigen Einfluss auf die periphere Insulinresistenz nehmen und die kardiovaskuläre Mortalität signifikant reduzieren. Unter anderem wurde dies auf die Senkung des systemischen Angiotensin-II-Spiegels zurückgeführt [33, 34].

Einen ähnlichen Ansatz verfolgte die 2002 veröffentlichte LIFE-Studie, die die Wirkung des Angiotensin-Antagonisten Losartan mit derjenigen des selektiven β 1-Rezeptorenblockers Atenolol auf die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität bei Patienten mit arterieller Hypertonie und linksventrikulärer Hypertrophie (LVH) verglich. Die Standardtherapie der essentiellen Hypertonie bestand bis dato in β -Rezeptor-Blockern, die nachgewiesenermaßen die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität senken konnten. Aufgrund der oben genannten Forschungsentwicklungen vermutete man eine therapeutische Überlegenheit der Angiotensin-Rezeptor-Blocker (ARBs) gegenüber der β -Blockade, vor allem bei Patienten mit elektrokardiographischen Zeichen einer LVH. Diese Hypothese konnte durchweg bestätigt werden. Es zeigte sich eine ausgeprägte Überlegenheit von Losartan in Bezug auf die definierten Endpunkte Tod, Apoplex und Myokardinfarkt trotz vergleichbar effizienter Blutdrucksenkung [35]. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die therapeutischen Erfolge der ARBs nicht nur aus der hämodynamischen Wirkung resultieren, sondern vielmehr aus der Verzögerung bzw. Regression der ungünstigen linksventrikulären Umbauprozesse.

In einer Subgruppenanalyse wurde der präventive Effekt von Losartan vs. Atenolol bei hypertensiven Diabetikern untersucht. Auch hier konnte eine signifikante Risikoreduktion nachgewiesen werden, vor allem im Sinne einer ausgeprägteren Reduktion der linksventrikulären Hypertrophie bei der Losartan-randomisierten Patientengruppe. Dies wurde vor allem auf die effektivere Protektion des kardialen

Einleitung

Gewebes gegenüber dem myokardialen Wachstumsfaktor Angiotensin II zurückgeführt [36].

Schon bald stellte sich jedoch heraus, dass eine Dauertherapie mit ACE-Inhibitoren oder ARB's die profibrotische Aldosteronwirkung nicht gänzlich verhindern kann. Trotz fortgeführter Applikation von ACE-Hemmern kommt es zum sogenannten „Aldosteron-Escape-Phänomen“, einem Wiederanstieg des Plasma-Aldosterons bei niedrigen Angiotensin-II-Spiegeln [37, 38].

Den Benefit einer vollständigeren Blockade der schädigenden Aldosteron-Wirkung untersuchte die 1999 veröffentlichte RALES-Studie, die die Wirkung des Aldosteron-Antagonisten Spironolacton auf Morbidität und Mortalität bei Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz thematisierte. Hier wurden mit ACE-Inhibitoren und Diuretika vorbehandelte Patienten jeweils zusätzlich mit Spironolacton bzw. einem Placebo behandelt. Aufgrund durchschlagender Ergebnisse musste die Studie jedoch bereits vor Ablauf der veranschlagten Studiendauer abgebrochen werden. Es stellte sich heraus, dass die Spironolacton-randomisierten Patienten ein geringeres Risiko hatten, an progressivem Herzversagen oder plötzlichem Herztod zu versterben. Die erheblich bessere Wirksamkeit von Spironolacton im Gegensatz zur bisherigen Therapie mit ACE-Hemmern wurde vor allem durch die zeitlich begrenzte Unterdrückung der Aldosteron-Produktion durch ACE-Hemmer begründet im Gegensatz zur dauerhaften Blockierung der Aldosteron-Rezeptoren durch den Aldosteron-Antagonisten Spironolacton [31].

Die EPHESUS-Studie testete die zusätzliche Applikation des neueren, selektiveren Aldosteron-Antagonisten Eplerenon ergänzend zur optimalen medikamentösen Therapie bei Patienten nach akutem Myokardinfarkt kompliziert durch Linksherzversagen. Es handelte sich um eine Placebo-kontrollierte Studie. Hierbei zeigte sich, dass die Gabe eines Aldosteron-Antagonisten eine wertvolle Ergänzung zur herkömmlichen Therapie darstellt. Sie erniedrigt sowohl die kardiovaskuläre Mortalität als auch die Hospitalisierungsrate signifikant. Aufgrund der höheren Selektivität für Mineralkortikoidrezeptoren von Eplerenon im Gegensatz zu Spironolacton, das auch an Progesteron und Corticosteroid-Rezeptoren bindet, fiel in dieser Studie das Nebenwirkungsprofil niedriger aus als in der RALES-Studie [39]. In der 4E-Studie stellte sich als effektivste Therapie im Hinblick auf Blutdrucksenkung und Rückbildung der LVH eine Kombination aus dem Aldosteron-Antagonisten

Einleitung

Eplerenon und dem ACE-Hemmer Enalapril im Vergleich zur Monotherapie mit einem der beiden Präparate heraus [40].

In verschiedenen tierexperimentellen Studien konnte beobachtet werden, dass die durch Aldosteron verursachte kardiale Fibrosierung in Zusammenhang mit gleichzeitiger Salzexposition steht. Tiere mit Normalsalzdiät entwickelten weder Hypertonie noch kardiale Fibrose [27, 41].

Endemann et al. untersuchten 2004 den Einfluss von nutritiver Salzzufuhr auf die aldosteroninduzierte Endorganschädigung bei SHRSP-Tieren. Hier zeigte sich, dass ein Mineralkortikoid-Antagonismus mit Eplerenon sowohl die kardiale Hypertrophie als auch die vaskuläre Fibrosierung signifikant senken kann. Dies gilt vor allem bei Tieren mit Hochsalzdiät [42].

In dieser Arbeit und der zugrunde liegenden experimentellen Studie soll nun die kardiale Fibrosierung in Abhängigkeit von Salzbelastung und Aldosteronantagonismus an ZDF-Ratten, einem Tiermodell des metabolischen Syndroms, geprüft werden.

Ferner untersuchten wir anhand unseres Tiermodells, ob die linksventrikuläre Proteinkonzentration bzw. die Genexpression der natriuretischen Peptide ANP und BNP als mögliche laborchemische Parameter einer fortschreitenden Herzinsuffizienz infolge eines metabolischen Syndroms ansteigen.

Die natriuretischen Peptide ANP und BNP sind wichtige Regulatoren im Elektrolyt- und Flüssigkeitshaushalt. ANP wird vor allem im linken Vorhof und in den Nieren gebildet, wohingegen BNP hauptsächlich in den Kardiomyozyten der Ventrikel synthetisiert wird. Beide Peptide zirkulieren im Plasma und beeinflussen den Flüssigkeitshaushalt durch Unterdrückung der renalen Natrium-Reabsorption. Ferner vermitteln sie eine Guanylat-Cyclase-Rezeptor Typ A-abhängige Blutdrucksenkung durch periphere Vasodilatation [43]. In der Literatur finden sich Hinweise darauf, dass ANP und BNP bei bevorstehender kardialer Dekompensation vermehrt exprimiert werden [44, 45]. Für die kardiale Dekompensation infolge eines metabolischen Syndroms ist ein derartiger Zusammenhang bislang nicht belegt.

Einleitung

Folgende Hypothesen sollen in unserer Studie untersucht und diskutiert werden:

1. Das Vorliegen eines hyporeninämischen Hyperaldosteronismus führt bei ZDF-Ratten zu kardialer linksventrikulärer Fibrosierung. Diese ist wesentlich ausgeprägter bei Tieren unter gleichzeitiger nutritiver Salzbelastung.
2. Eplerenon bzw. Spironolacton verhindert die kardiale Hypertrophie, v. a. bei Tieren unter Salzbelastung.
3. Hochsalzdiät führt bei ZDF-Ratten zur Blutdrucksteigerung. Dies verstärkt zusätzlich die Entwicklung von kardialer Hypertrophie und Fibrosierung. Durch Aldosteronblockade kann Eplerenon diese Effekte verhindern.
4. Die antifibrotische Wirkung ist nicht nur auf die systemische Blutdrucksenkung zurückzuführen, sondern vor allem auf die direkte Rezeptor-Blockade am Myokard. Deshalb wirkt Hydralazin weniger antifibrotisch als Eplerenon.
5. Diabetische Tiere sind physisch weniger belastbar. Die Belastbarkeit ist besser bei mit Eplerenon behandelten Tieren, da diese eine weniger stark ausgeprägte linksventrikuläre Hypertrophie aufweisen. Analog zu 4. ist eine Therapie mit Hydralazin weniger effektiv.
6. Die linksventrikuläre Konzentration der natriuretischen Peptide ANP und BNP steigt mit zunehmendem Blutdruck und linksventrikulärer Hypertrophie. Sie können deshalb als Maß für die kardiale Schädigung bei Tieren mit metabolischem Syndrom verwendet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Das Tiermodell

Für den Versuch (Versuchsnummer 205, Genehmigungsnummer Aktenzeichen 621-2531.1-2/05) wurden männliche *Zucker Diabetic Fatty Ratten* (Charles River Laboratories, Wilmington, Massachusetts, USA) verwendet. Hierbei handelt es sich um ein etabliertes Tiermodell, das den menschlichen NIDDM simuliert. Dies wird durch eine genetische Manipulation und eine spezielle Diät erreicht.

Das Ehepaar Zucker beschrieb 1961 erstmals das sogenannte „fatty“ (fa)-Gen, im Gegensatz zum Fa-Allel des Wildtyps. Diese Tiere wurden nach den Erstbeschreibern *Zucker Fatty (ZF) – Ratten* benannt [46]. Die zugrunde liegende Mutation resultiert in einem verkürzten Leptin-Rezeptor-Protein, wodurch die Interaktion zwischen Leptin (produziert in Adipozyten) und seinem hypothalamischen Rezeptor gestört wird. Infolgedessen kommt es zu einer pathologischen Nahrungsaufnahme mit Ausbildung einer stammbetonten Fettleibigkeit. Gleichzeitig bestehen eine Hypertriglyceridämie und eine Hypercholesterinämie sowie eine Hyperinsulinämie, was schließlich zur peripheren Insulinresistenz führt [47-49].

Einige der männlichen ZF-Tiere wurden spontan diabetisch, und zeigten starkes Übergewicht, hohe Glucose-Spiegel und eine gestörte Glucose-Toleranz. Diese Linie wurde durch Inzucht ausgewählter Rattenpärchen von Dr. R. Peterson weiter etabliert, bis schließlich die endgültige Reihe der *Zucker Diabetic Fatty (ZDF) - Ratte* entstand [50]. Diese wurde 1991 patentiert und von Charles River Laboratories aufgekauft.

Ab der sechsten Lebenswoche entwickeln die homozygoten Ratten (Stamm ZDF/GmiCrl-fa/fa; nachfolgend ZDF-Ratten) relativ rasch Adipositas, Hyperglykämie und Hyperlipidämie, wohingegen die heterozygoten Tiere (Stamm ZDF/GmiCrl-Fa/fa; nachfolgend ZDL-Ratten), die in diesem Versuch als Kontrolltiere verwendet wurden, normoglykämisch bleiben [50-52].

In Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe wurde überdies gezeigt, dass diese Tiere einen hyporeninämischen Hyperaldosteronismus entwickeln [17].

2.2 Gruppensammensetzung

Die Tiere wurden zwischen der 8. und 10. Lebenswoche geliefert und im Alter von 15 Wochen, also nach Entwicklung der Hyperglykämie, in sieben Versuchsgruppen eingeteilt, die sich folgendermaßen darstellten:

Beschreibung	Anzahl der Tiere (n)	im Folgenden genannt
ZDL mit 0,28% NaCl Futter	9	„ZDL-Kontrolle“
ZDL mit 4 - 5,5% NaCl Futter	9	„ZDL + Salz“
ZDF mit 0,28% NaCl Futter	9	„ZDF-Kontrolle“
ZDF mit 4 – 5,5% NaCl Futter	9	„ZDF + Salz“
ZDF mit 4 – 5,5% NaCl + Eplerenon	9	„ZDF + Eplerenon“
ZDF mit 4 – 5,5% NaCl + Eplerenon Futter	10	„ZDF + Salz + Eplerenon“
ZDF mit 4 – 5,5% NaCl + Hydralazin Futter	8	„ZDF + Salz + Hydralazin“

Tabelle 1 Gruppeneinteilung

2.3 Tierhaltung

In einem klimatisierten Tierstall wurde durch die Verwendung einer Zeitschaltuhr ein zwölfstündiger Tag-Nacht-Rhythmus simuliert. Die Raumtemperatur betrug 20°C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 40–60%. Die Tierhaltung erfolgte in Einzelkäfigen auf StandardEinstreu für Labortiere, die von den Tierpflegern alle zwei Tage gereinigt wurden.

Alle geschilderten Versuche sind im Einklang mit dem deutschen Tierschutzgesetz.

2.4 Fütterung

Die Tiere erhielten Purina 5008 (Charles River Laboratories, Wilmington, Massachusetts, U.S.A), eine spezielle energiereiche Futtermischung, empfohlen von Charles River Laboratories. Nach Herstellerangaben setzt sich dieses Futter folgendermaßen zusammen:

Gewicht	Kalorien
Proteine 23%	Proteine 26,8%
Kohlehydrate 58,5%	Kohlehydrate 56,4%
Fette 6,5%	Fette 16%
Ballaststoffe 4%	
Rückstände 8%	

Tabelle 2 Zusammensetzung Purina-Futter

Die Nahrung wurde als Pulver geliefert, zum endgültigen Futteransatz wurde zu zwei Dritteln Pulver je ein Drittel Wasser hinzugegeben.

Material und Methoden

Je nach Gruppenzugehörigkeit bekamen die Tiere ab der 15. Lebenswoche Salz und/oder ein Medikament zum Futter beigemischt. In Intervallen wurden die dem Futter zugemischte Salz- bzw. Medikamentenkonzentration gesteigert:

Gruppe	Ab 15. Woche	Ab 18. Woche	Ab 21. Woche	Ab 22. Woche
ZDL + Salz	4% NaCl	5% NaCl	5,5% NaCl	5% NaCl
ZDF + Salz	4% NaCl	5% NaCl	5,5% NaCl	5% NaCl
ZDF + Eplerenon	100mg/kgKG Eplerenon	100mg/kgKG Eplerenon	100mg/kgKG Eplerenon	100mg/kgKG Eplerenon
ZDF + Salz + Eplerenon	4% NaCl + 100mg/kgKG Eplerenon	5% NaCl + 100mg/kgKG Eplerenon	5,5% NaCl + 100mg/kgKG Eplerenon	5% NaCl + 100mg/kgKG Eplerenon
ZDF + Salz + Hydralazin	4% NaCl + 12,5 mg/kgKG Hydralazin	5% NaCl + 12,5 mg/kgKG Hydralazin	5,5% NaCl + 25 mg/kgKG Hydralazin	5% NaCl + 25 mg/kgKG Hydralazin

Tabelle 3 Übersicht Salz- und Medikamentengabe

Vor Beginn der medikamentösen Therapie war es nötig, den durchschnittlichen Futtermittelverbrauch jedes Tieres zu bestimmen. Hierzu wurde das Futter an mehreren Tagen abends ein- und morgens wieder ausgewogen, um anhand der gefressenen Menge die richtige Medikamenten-Dosierung errechnen zu können. Während des Versuchs kontrollierte man den Futtermittelverbrauch regelmäßig, um die Dosierung nötigenfalls anpassen zu können. Das mit Medikamenten versetzte Futter sowie Wasser stand den Tieren jeweils ad libitum zur Verfügung.

2.5 Behandlung der Tiere

2.5.1 Eplerenon

Inspra®

Dieses seit September 2004 zur Behandlung der Herzinsuffizienz und der linksventrikulären Dysfunktion zugelassene Medikament ist eine Weiterentwicklung des Aldosteron-Antagonisten Spironolacton mit einer höheren Selektivität am Mineralcorticoid-Rezeptor. Eplerenon wirkt über kompetitive Hemmung des Nebennierenrindenhormons Aldosteron am zytosolischen Rezeptor für Mineralkortikoide. Diese Rezeptoren werden sowohl in der Niere als auch in Herz, Blutgefäßen und Gehirn exprimiert [53].

Hintergrund für diesen Versuch ist die bereits nachgewiesene protektive Wirkung von Eplerenon auf die Aldosteron-induzierte kardiale Fibrosierung und die ventrikuläre Dysfunktion beim metabolischen Syndrom in Abhängigkeit von der Salzbelastung [42].

2.5.2 Hydralazin

Hydralazin wirkt durch eine Beeinflussung des zellulären Calcium-Stoffwechsels in glatten Muskelzellen als peripherer Vasodilatator und Antihypertensivum [54]. Es wurde für eine zweite Kontrollgruppe eingesetzt, um auszuschließen, dass die bei Einsatz von Eplerenon beobachteten Veränderungen allein auf die antihypertensive Wirkung des Aldosteron-Antagonisten zurückzuführen sind.

2.6 Verlaufsparemeter

2.6.1 Körpergewicht

Wöchentlich wurden die Tiere gewogen und der Verlauf der Gewichtszunahme dokumentiert.

2.6.2 Blutzucker

Die wöchentliche Blutzuckermessung war erforderlich, um die diabetische Stoffwechsellage zu dokumentieren. Hierfür entfernte man den Tieren morgens gegen sieben Uhr das Futter aus den Käfigen, um ca. sechs Stunden später einen Nüchternwert zu bestimmen. Die Ratten wurden in kleine Drahtkäfige gesetzt, der Schwanz mit warmem Wasser etwas erwärmt, und anschließend mit einer feinen Kanüle die Vene punktiert. Der erste Tropfen wurde, analog zur Messung beim Menschen, verworfen, und der Blutzuckerwert mithilfe eines Accu Check-Geräts doppelt bestimmt. Diese Werte wurden gemittelt.

2.6.3 Blutdruck und Herzfrequenz

Die Messung des systolischen Blutdrucks und der Herzfrequenz erfolgte ebenfalls wöchentlich, mit der nicht-invasiven tail-cuff-Methode. Dabei kann nur der systolische Druck erfasst werden. Dies funktioniert analog der Methode nach Riva Rocci. Hierzu wurden die Tiere wiederum in die kleinen Drahtkäfige gesetzt, um sie in ihrer Bewegungsfreiheit einzuschränken. Anschließend wurde der Rattenschwanz mit Rotlicht bestrahlt, um so eine temperaturinduzierte Dilatation der Arterie zu erreichen. Damit wurde die Perfusion soweit gefördert, dass die Ableitung einer messbaren Pulskurve möglich war. Als nächstes wurde der Cuff am Schwanz nahe der Schwanzwurzel, und weiter distal der piezoelektronische Pulsaufnehmer angelegt. Beide waren direkt mit der Steuereinheit des Geräts verbunden. Der Pulsaufnehmer wandelt die Druckschwankungen der Arterie in ein elektrisches Signal um, das einen Schreiber auf dem Gerät steuert. Nach einer kurzen Eingewöhnungsphase, die nötig war, um aufregungsbedingte Blutdruckspitzen zu

verhindern, wurde die Manschette soweit aufgeblasen, bis der Sensor kein elektrisches Signal mehr erkennen konnte und so der Schreiber keinen Ausschlag mehr durchführte. Dann erfolgte eine Druckabsenkung, solange bis der Schreiber wieder Druckschwankungen registrierte. An diesem Punkt wurde der Druck (in mmHg) abgelesen. Gleichzeitig bestimmt das Gerät die Herzfrequenz anhand der Anzahl der Druckschwankungen pro Minute. Die Messungen wurden dreifach durchgeführt und anschließend gemittelt.

2.6.4 Belastungstest

Um die kardiopulmonale Belastungsfähigkeit zu prüfen, wurde in der 23. Lebenswoche ein Laufband-Test durchgeführt. Hierzu mussten die Tiere auf einem Laufband mit einem Neigungswinkel von 6° laufen. Die Laufbandgeschwindigkeit wurde alle fünf Minuten sukzessive erhöht, siehe Tab. 4.

Stufe	Laufbandgeschwindigkeit in m/min
Stufe I	10
Stufe II	15
Stufe III	20
Stufe IV	25
Stufe V	30

Tabelle 4 Laufbandgeschwindigkeiten

Als Abbruchkriterium definierte man das zweimalige Verbleiben des jeweiligen Tieres auf der unter Spannung stehenden hinteren Plattform über einen Zeitraum von mehr als fünf Sekunden. Die Ergebnisse wurden angegeben in Form der gelaufenen Strecke in Metern.

2.6.5 Herzechokardiographie

In der 24. Lebenswoche wurde eine transthorakale Echokardiographie durchgeführt. Hierfür wurden die Tiere mit 6-8mg Xylazin pro kgKG und 90-120mg Ketamin pro kgKG narkotisiert. Es wurden zweidimensionale M-Mode Bilder des linken Ventrikels gewonnen und IVSd, IVSs, LVIDd, LVIDs, LVPWd und LVPWs bestimmt. Die Berechnung der Verkürzungsfraction erfolgte mit folgender Formel:

$$FS = (LVIDd-LVIDs) / LVIDd \times 100 \%$$

2.7 Versuchsende

Nach Gewichtsermittlung wurden die Tiere in der 25./26. Lebenswoche durch Dekapitation getötet. Plasma und Serum wurden in EDTA- bzw. Serum-Röhrchen aufgefangen und bei -80°C aufbewahrt. Anschließend wurden folgende Organe asserviert:

- Herz: Das Herz wurde unterhalb der Klappenebene in drei gleichmäßige Scheiben geteilt. Hiervon wurden die ersten beiden Teile in flüssigen Stickstoff gegeben, und der dritte Teil in Paraformaldehyd konserviert.
- Außerdem wurden noch Mesenterium, Aorta, Nieren, Leber, subkutanes und perirenales Fettgewebe, Gehirn und Augen zur weiteren Untersuchung asserviert sowie die Tibialänge gemessen.

2.8 Versuchsablauf

	26	25	24	23	22	21	20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	
LW																					
BZ	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Gewicht	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
RR	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Metabolischer Käfig			x					x				x					x				
Laufband																					
Echokardiographie			x																		
Organentnahme	x																				

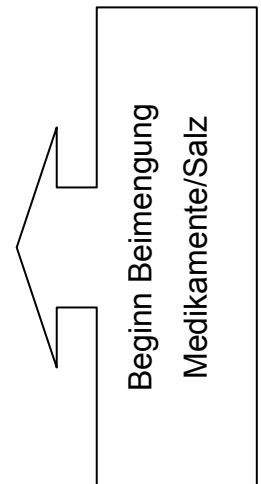


Tabelle 5 Übersicht über das Versuchsdesign

2.9 Bestimmung der ANP-/BNP-Genexpression im linken Ventrikel

2.9.1 RNA-Extraktion

Die Extraktion von RNA aus den Zellen des linken Ventrikels erfolgte mit Hilfe des RNeasy Midi Kit von Qiagen. Grundlage des Systems ist eine Säule aus Kieselgel. An dieser kann sich, bedingt durch ein spezielles Puffersystem, bis zu 1mg mindestens 200bp lange RNA anlagern.

Hierbei wurden ca. 30mg Gewebe zuerst in einem Lösungsmittel homogenisiert. Dieses wirkt hochgradig denaturierend und schützt so die RNA vor vorhandenen RNasen. Anschließend wurden die Proben mit Proteinase K behandelt, um die RNA von etwaigen Proteinresten zu befreien. Nach Abzentrifugation von Abfallstoffen löste man die gesäuberten Proben in Ethanol, um ein optimales Milieu für die Bindung zu schaffen, und gab sie auf die Säule. Dort bindet dann die vorhandene RNA durch hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial. Um eventuell verbliebene DNA-Reste zu entfernen, wurde ein DNase-Verdau (RNase-Free DNase Set) zwischengeschaltet. Nach mehreren Waschgängen zur Befreiung der RNA von weiteren Verunreinigungen, erfolgte die Elution in RNase freiem Wasser. Um die Reinheit der verbliebenen RNA zu messen, führten wir eine photometrische Quantifizierung und Reinheitskontrolle bei 230 und 260nm durch. Die RNA-Lösung wurde bei -80°C aufbewahrt.

2.9.2 Reverse Transkription

Die gewonnene RNA kann mit der PCR nicht amplifiziert werden, deshalb ist es nötig, sie in cDNA umzuschreiben. Dies erfolgt mit Hilfe des Enzyms M-MLV RT, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase.

Von jedem Organ benötigte man 1µg RNA; die aus den auf -80°C gelagerten Proben zu entnehmende Menge an Flüssigkeit ergab sich durch die oben erwähnte Konzentrationsbestimmung. Diese wurde jeweils mit destilliertem Wasser auf 14µl aufgefüllt und 1,5µl Random Primer-Lösung kamen hinzu. Random Primers sind unspezifische Oligonukleotid-Sequenzen, die eine Umschreibung der kompletten RNA in cDNA ermöglichen.

Material und Methoden

Die Reaktion wurde in Eppendorf-Cups durchgeführt. Nach Aktivierung der Primer durch Erhitzen der Cups für 3min auf 70°C wurden jeweils 14,5ml eines vorher erstellten Basen-Mix (s.u.) hinzugegeben und 1 Stunde lang in einem Heizblock bei 37°C inkubiert.

Der Basen-Mix enthielt:

6µl dNTP-Solution (2,5mmol/l)

6µl M-MLV RT 5x Puffer

1µl RNasin Ribonuclease Inhibitor

Um die Reaktion zu katalysieren, wurden 1,5µg des Enzyms *Moloney murine leukemia virus* - Reverse Transkriptase (M-MLV RT) hinzugegeben.

Als Negativkontrolle wurde parallel jede Probe nochmals mit dem gleichen Mix, nur ohne Enzymzugabe, behandelt.

Nach Ablauf der Zeit kamen die Eppendorf-Cups zur Inaktivierung der RT erneut für 2min in einen Heizblock, diesmal bei 95°C. Die entstandene cDNA wurde mit destilliertem Wasser auf 150µl aufgefüllt und für die PCR bei -20°C eingefroren.

2.9.3 Taqman-PCR

Zur Quantifizierung der RNA wurde eine Taqman-PCR durchgeführt, bei der die mRNA-Expression von ANP und BNP von Interesse war.

2.9.3.1 Grundlagen

Die Mitte der achtziger Jahre von Kary Bank Mullis entwickelte PCR-Methode beruht auf der Idee, DNA mithilfe des Enzyms DNA-Polymerase durch sich wiederholende Verdopplung zu vermehren. Das Verfahren funktioniert nach dem Prinzip der Primer-definierten enzymatischen in-vitro-Replikation, bei der durch zyklisch wiederholte Arbeitsschritte eine annähernd exponentielle Amplifikation der gesuchten Sequenz erreicht werden kann [55].

Beim 1993 von Lee et al. entwickelten Taqman PCR Assay gelingt es nun, durch mit einem fluoreszierenden Farbstoff markierte Sonden, die Menge der entstehenden Produkte im selben Arbeitsschritt (Real Time) zu quantifizieren. Es

wird eine Sonde verwendet, die an einem Ende mit einem Fluoreszenz-Reporterfarbstoff, am anderen Ende mit einem Quencher markiert ist. Die Nähe des Quenchers zum Fluorophor unterdrückt dessen Wirkung. Wenn nun aber durch die Taq-DNA-Polymerase der Strang synthetisiert wird, kommt es zur Lyse der Sonde und somit zur räumlichen Dissoziation von Quencher und Fluorophor. Dann entsteht ein detektierbares Signal.

Das Fluoreszenz-Signal kann nur gebildet werden, wenn es zu einer Amplifikation der Zielsequenz kommt, da nur dann eine Hydrolyse der Sonde durch die DNA-Polymerase stattfindet. So verhindert man eine Detektion irrelevanter Nebenprodukte. Der Anstieg der Fluoreszenz steht in direkter Proportionalität zur Menge des Amplifikats. Dies wird jeweils am Ende bzw. während der einzelnen Zyklen gemessen. Hierdurch unterscheidet sich die Real-Time PCR von anderen quantitativen PCR-Methoden, die erst am Ende ausgewertet werden können [56].

Zur Bestimmung der ANP- und BNP-Expression wurde das Verfahren der relativen Quantifizierung angewandt. Hierbei misst man die Zielsequenz in Relation zu einer zweiten, nicht verwandten Struktur, einem sogenannten Housekeeper. Dies ist ein Gen, das für die Aufrechterhaltung aller Zellen essentiell ist und daher ubiquitär exprimiert wird. Da es weder reguliert noch durch die Versuchsbedingungen beeinflusst wird, kann man es als Referenzwert benutzen und die Zielstruktur in Relation dazu setzen.

2.9.3.2 Durchführung

Zur Durchführung der Taqman-PCR wurde der Taqman Gene Expression Assay (Applied Biosystems) verwendet. Die Reaktion fand in einer 384-well-Mikrotiterplatte statt, in die jeweils 9µl der umgeschriebenen cDNA bzw. Negativ-Kontrolle gegeben wurde, zusätzlich 11µl eines zuvor hergestellten Reaktionsmix.

Der Mix enthielt je 1µl ANP-, BNP- oder Calsequestrin (Housekeeper)-Primer und 10µl Master-Mix (Teil des Kit), so dass pro Well ein Endvolumen von 20µl entstand.

Die PCR erfolgte mithilfe des Taqman-Gerätes von Applied Biosystems. Das verwendete Protokoll bestand aus folgenden Parametern: 2min Enzymaktivierung bei 50°C, 10min Denaturierung bei 95°C, danach 40 Zyklen mit jeweils 15sec Denaturierung bei 95°C und 1min Annealing (Anlagerung der Primer) und Elongation (Synthese des Strangs) bei 60°C.

Um einen Bezugswert zu haben, wird als interner Standard im gleichen Arbeitsschritt auch die Menge einer sogenannten Housekeeping-DNA mitbestimmt. Darunter versteht man ein Gen, das in jeder Körperzelle gleichartig exprimiert wird und keinerlei Regulation unterliegt. In der Regel sind dies Gene, die der Aufrechterhaltung des Zellstoffwechsels dienen [57]. In diesem Falle wurde dazu das in Muskelzellen von Wirbeltieren vorkommende Calcium-bindende Protein Calsequestrin benutzt.

Zur tatsächlichen Quantifizierung der vorhandenen DNA-Menge des jeweiligen mRNA-Genproduktes wurde nun aus jeweils zwei Proben eines Tieres der Mittelwert bestimmt, und das Ergebnis wurde dann auf den ebenfalls aus einer Doppelbestimmung der Proben desselben Tieres gemittelten Housekeeper bezogen. So konnten etwaige Pipettierschwankungen herausgerechnet werden.

2.10 Bestimmung der ANP-/BNP-Proteinmenge im linken Ventrikel

2.10.1 Proteinextraktion aus Gewebe

Um die Gesamtheit der im Gewebe vorkommenden Proteine zu extrahieren, wurden jeweils 60 bis 80mg der eingefrorenen Proben des linken Ventrikels mit dem Skalpell abgetrennt und im Verhältnis von 1:10 in einen Homogenisierungspuffer gegeben. Der Puffer bestand aus 5mM TRIS-HCl, 300mM Sucrose, 0,1mM EDTA und 0,01mM PMSF. TRIS-HCl wurde als Puffersubstanz verwendet, EDTA fungierte als Calciumkomplexbildner, und PMSF diente als Proteaseninhibitor, ebenso PIC. Die Proben wurden immer gut auf Trockeneis gekühlt, um zusätzlich noch dem Proteinabbau durch im Gewebe enthaltene Proteasen entgegenzuwirken. Im nächsten Arbeitsschritt erfolgte die Homogenisierung mithilfe eines Homogenisators, und anschließend wurden die Proben bei 4°C 15min bei 4000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.10.2 Bestimmung der Gesamtproteinmenge

Um die einzusetzende Probenmenge für die geplanten RIAs zu bestimmen, erfolgte zunächst eine Proteinbestimmung mit der Methode nach Pierce [58, 59].

Die zugrunde liegende Methode ähnelt der Biuret-Reaktion. Proteine reduzieren Kupfer-II-Ionen in alkalischer Umgebung zu Kupfer-I-Ionen. Durch die Komplexbildung mit Bicinchoninic Acid Solution (BAS) entsteht ein violettes Reaktionsprodukt, das man durch photometrische Vermessung bei 540nm sichtbar machen kann.

Zunächst ist es notwendig, eine Standardreihe mit bekannten Konzentrationen zu erstellen. Dazu wurden aus einer Protein-Stammlösung der bekannten Konzentration von 80mg/ml eine Verdünnungsreihe mit abfallender Konzentration (8mg/ml, 4mg/ml, 2mg/ml, 1mg/ml, 0.5mg/ml, 0.25mg/ml, 0.125mg/ml und 0.0625mg/ml) hergestellt. Diese bekannten Verdünnungen wurden, genau wie die unbekanntes Proben, mit einem Reaktionsgemisch aus BAS und Kupfer(II)-Sulfat in einer Mikrotiterplatte eine Stunde lang bei 37°C inkubiert. Die Auswertung erfolgte photometrisch und mit Hilfe des Computerprogramms Softmax. Anhand der Extinktionswerte der bekannten Standardlösungen wurde eine Eichkurve erstellt, und jeder der unbekanntes Proben konnte so eine Konzentration zugeordnet werden. Es wurden sowohl für die Standard- als auch für die unbekanntes Konzentrationen Doppelbestimmungen durchgeführt.

2.10.3 RIA

2.10.3.1 Prinzip

Die Methode des Radioimmunoassay dient der quantitativen Bestimmung kleinster Proteinmengen. Es handelt sich um eine kompetitive Antigen-Antikörper-Reaktion.

Das zu messende Antigen wird zusammen mit einer bekannten Menge an radioaktiv markiertem Antigen sowie einer bekannten Menge an spezifischen Antikörpern zur Reaktion gebracht. Es erfolgt eine Bindung der Antikörper sowohl an die zu bestimmenden als auch an die markierten Antigene. Das zu messende Agens konkurriert mit dem radioaktiv markierten Antigen um die Antikörper-Bindungsstelle, da dieser keine Unterscheidung zwischen den beiden Molekülen trifft. Je höher die

Konzentration des nicht-markierten Antigens, desto mehr markiertes Antigen wird aus der Bindung verdrängt. Als Ergebnis dieser kompetitiven Hemmung nimmt das Verhältnis von gebundenem zu freiem radioaktiv markiertem Antigen mit zunehmender Konzentration an nicht-markiertem Antigen indirekt proportional ab. Die entstandenen Komplexe werden durch Zugabe eines zweiten Antikörpers gebunden. Durch Abzentrifugation können diese nun quantitativ erfasst werden. Anhand einer Eichkurve ist durch Extrapolation die Bestimmung der unbekanntem Antigenmengen dann möglich [60].

2.10.3.2 Ablauf

Die RIAs auf ANP und BNP erfolgten mit Hilfe der Kits von Phoenix Pharmaceuticals. Diese haben laut Herstellerangaben einen Nachweisbereich von 10-1280pg pro Tube.

Es wurde insgesamt vier RIAs durchgeführt, jeweils zur Untersuchung von ANP und BNP im Blutplasma und im Gewebe des linken Ventrikels.

Inhalte des Kits:

- RIA Puffer Konzentrat 50ml
- Standardpeptid 12,8µg
- Spezifische Kaninchen-Antikörper (1. AK)
- ¹²⁵I-Peptid 1,5µCi
- Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-Körper (2. AK)
- Normales Kaninchen-Serum

Material und Methoden

Vorbereiten des RIA-Puffers, des Standard-Peptids und des Kaninchen-Antikörpers nach Hersteller-Angaben.

Standardreihe:

Es wurde eine Standard-Verdünnungsreihe nach folgendem Schema angefertigt:

Röhrchen	Probe	RIA-Puffer	Menge des Standardpeptids
0	10µl der Stammlösung	100µl	
A	10µl aus „0“	990µl	1280pg/Röhrchen
B	500µl aus „A“	500µl	640pg/ Röhrchen
C	500µl aus „B“	500µl	320pg/ Röhrchen
D	500µl aus „C“	500µl	160pg/ Röhrchen
E	500µl aus „D“	500µl	80pg/ Röhrchen
F	500µl aus „E“	500µl	40pg/ Röhrchen
G	500µl aus „F“	500µl	20pg/ Röhrchen
H	500µl aus „G“	500µl	10pg/ Röhrchen

Tabelle 6 Herstellung der Verdünnungsreihe

Material und Methoden

Doppelbestimmungen der bekannten und unbekanntem Antigenkonzentrationen entsprechend der folgenden Tabelle:

Röhrchen	Inhalt	RIA-Puffer	Standard/Proben	1.AK	¹²⁵ I-Peptid
TC-1 und -2	Total counts				100µl
NSB-1 und -2	Non-specific-binding	200µl			100µl
TB-1 und -2	Total binding	100µl		100µl	100µl
7,8	H Standard		100µl	100µl	100µl
9,10	G Standard		100µl	100µl	100µl
11,12	F Standard		100µl	100µl	100µl
13,14	E Standard		100µl	100µl	100µl
15,16	D Standard		100µl	100µl	100µl
17,18	C Standard		100µl	100µl	100µl
19,20	B Standard		100µl	100µl	100µl
21,22	A Standard		100µl	100µl	100µl
23,24	Probe 1		100µl	100µl	100µl
25,26	Probe 2		100µl	100µl	100µl
27,28	Probe 3		100µl	100µl	100µl
etc.	etc.		100µl	100µl	100µl

Tabelle 7 Übersicht über die RIA-Röhrchen am Ende des 2. Versuchstages

Durchführung:

In alle Röhrchen mit Ausnahme von TC-1 und -2 sowie NSB-1 und -2 wurden jeweils 100µl des ersten AK (spezifischer Kaninchen-AK) gegeben. Alle Röhrchen wurden mit Hilfe eines Vortexers gemischt und für 16-24h bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden jedem Röhrchen 100µl der vorbereiteten Tracer-Lösung (¹²⁵I-Peptid) zugefügt. Erneute Inkubation für weitere 16-24h bei 4°C.

Nach der Inkubationszeit erfolgte die Zugabe des Ziegen-Anti-Kaninchen-AK (2. AK), des Normalen-Kaninchen-Serums, sowie von RIA-Puffer in alle Röhrchen,

mit Ausnahme der TC-Röhrchen. Die Röhrchen wurden wiederum gevortext und anschließend für 90min bei Raumtemperatur inkubiert.

Alle Proben wurden bei 3000rpm 20min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde unmittelbar nach Zentrifugation mit einer Wasserstrahlpumpe abgenommen.

Die Vermessung der Radioaktivität erfolgte mit dem Gamma Counter Cobra II der Firma Packard.

2.11 Histologische Untersuchungen

Der in Paraformaldehyd konservierte Anteil des linken Ventrikels wurde in Paraffin eingebettet und mit einem Schlittenmikrotom in 5µm dicke Scheiben geschnitten. Diese wurden in ein Wasserbad verbracht, um anschließend auf einen Glasobjektträger aufgezogen zu werden. In dieser Form bleiben die Schnitte für längere Zeit stabil.

2.11.1 Hämalaun-Eosin-Färbung

Zur histologischen Diagnostik wurden Paraffinschnitte des linken Ventrikels angefertigt. Die Schnitte wurden zweimal 5min in Xylol entparaffiniert und im Anschluss daran in einer absteigenden Alkoholreihe (Ethanol 100%, 96%, 80% und 70%) rehydratisiert. Nach einem Waschgang (zweimal 5min in destilliertem Wasser) erfolgte die Färbung in unverdünnter Mayers Hämalaun-Lösung für 2min. Um den Kontrast zu optimieren wurde die Farbe nach Inkubation für 2min unter fließendem Leitungswasser gebläut. Hämalaun färbt anionische Strukturen blau. Deshalb kommt es zu einer Blaufärbung der Zellkerne, da in der DNA viele anionische Phosphatgruppen enthalten sind. Zur Gegenfärbung versetzte man Eosin G-Lösung mit einem Tropfen Essigsäure und färbte die Schnitte darin für 10sec. Eosin ist negativ geladen und färbt kationische Strukturen rot. So kommt es zur Rotfärbung von Erythrozyten, Bindegewebsanteilen und Muskulatur. Anschließend Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe. Um die Schnitte zu konservieren, erfolgte das Eindeckeln in Depex.

2.11.2 Sirius-Red-Färbung

Zur Quantifizierung des linksventrikulären Fibrosegrades wurden Paraffinschnitte des linken Ventrikels verwendet. Zunächst erfolgte wiederum die Entparaffinierung der Schnitte in Xylol und die Rehydratisierung in einer absteigenden Alkoholreihe. Nach je zweimaligem Waschen in 1% Tween-PBS und destilliertem Wasser (jeweils 5min) erfolgte die 30minütige Inkubation im Farbstoffgemisch, bestehend aus 100mg Sirius Red Reagens sowie 100mg Fast Green FCF und 100ml Picrinsäure. Da es sich hierbei um lichtempfindliche Substanzen handelt, erfolgte dieser Schritt unter Lichtabschluss. Nach Ablauf der Inkubationszeit schloss sich ein weiterer Waschgang an, zunächst zweimal 5min in destilliertem Wasser, dann Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe. Um die Schnitte zu konservieren, erfolgte das Eindeckeln in Depex. Bei der hier angewandten Färbetechnik erscheint Bindegewebe spezifisch rot und alle anderen Gewebe grün. Der Fibrosierungsgrad des linken Ventrikels wurde lichtmikroskopisch mit einer speziellen Software (Metavue) quantifiziert.

2.11.3 Immunhistochemie auf Laminin

Fünf Mikrometer dünne Paraffinschnitte wurden zunächst zwei mal fünf Minuten in Xylol entparaffiniert und anschließend jeweils zwei Minuten in absteigender Alkoholreihe (100% Ethanol, 96 % Ethanol und 70% Ethanol) rehydratisiert. Es folgte eine Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität durch zehnmünütige Inkubation der Schnitte mit 1% H_2O_2 in einer feuchten Kammer, die ein Austrocknen der Schnitte verhindern sollte. Nach einem fünfminütigen Waschschrift in PBS erfolgte das Antigen-Retrieval, in dem die Schnitte für zwanzig Minuten mit Proteinase K versetzt wurden. Nach zwei weiteren Waschschriften in PBS wurden die Schnitte zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für zwanzig Minuten mit fünfprozentigem NSS-Tween-PBS inkubiert, nach Abklopfen dieser Lösung erfolgte die Auftragung des ersten Antikörpers (Laminin 1+2-AK rabbit polyclonal) und die Inkubation für eine Stunde bei 37°C in einer feuchten Kammer. Nach erneutem zweimaligem Waschen erfolgte zunächst die Zugabe von Avidin-Reagens für 15min, nach einem zwischengeschalteten Waschschrift danach die Inkubation mit Biotin-Reagens, ebenfalls für 15min. Wiederum wurden die Schnitte in PBS gewaschen,

anschließend folgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (Goat-anti-rabbit-AK/HRP) für eine Stunde bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer. Nach erneutem Waschen schloss sich eine 30minütige Inkubation der Schnitte mit einem ABC-Peroxidase-Komplex (ABC-Kit-Standard) an. Im Folgenden wurde die eigentliche Färbung der Antigen-Antikörper-Komplexe mit Hilfe des DAB Liquide Substrate System (Kit) durchgeführt. Hierfür löste man zwei Tropfen Buffer Stock, vier Tropfen DAB Stock sowie zwei Tropfen Hydrogen Peroxid in 5ml destilliertem Wasser, nach jeder Zugabe wurde gut durchgemischt. Nach Inkubation der Schnitte mit jeweils 50µl der entstandenen Lösung für 5min folgte ein weiterer Waschschrift und dann unmittelbar die Gegenfärbung der Schnitte mit Methylgrün. Danach wurden die Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe (je zwei Minuten in 70% Ethanol, 96% Ethanol und 100% Ethanol) sowie in Xylol wieder dehydriert und schließlich in Depex eingedeckelt.

2.12 Analyse aus dem Blutserum

Die laborchemischen Untersuchungen wurden von der Abteilung für klinische Chemie, Klinikum der Universität übernommen. Es erfolgte eine Bestimmung von Natrium, Kalium, Gesamtcholesterin, HDL, LDL, Triglyceride und VLDL aus dem Blutserum.

2.13 Statistische Analysen

Für die Datenauswertung und die Erstellung der Grafiken wurde das Programm GraphPad Prism 5.0 verwendet. Die Angabe der Daten erfolgt in $MW \pm SEM$. Als statistisch signifikant wurden p-Werte $<0,05$ gewertet. Die statistische Analyse der Daten erfolgte durch One-way-ANOVA. Post-hoc testing durch den Newman Keuls Multi Comparison Test. Da aufgrund multiplen Testens bei 7 Gruppen (auch für nicht sinnvolle Gruppenvergleiche) der Post-hoc-Test z. T. negativ ausfiel, wurde orientierend in Einzelfällen ein t-Test durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Stammdaten

3.1.1 Körpergewicht

Alle Tiere nahmen im Verlauf des Versuchs an Gewicht zu. Die Kontrolltiere waren initial noch deutlich leichter als die diabetischen Tiere.

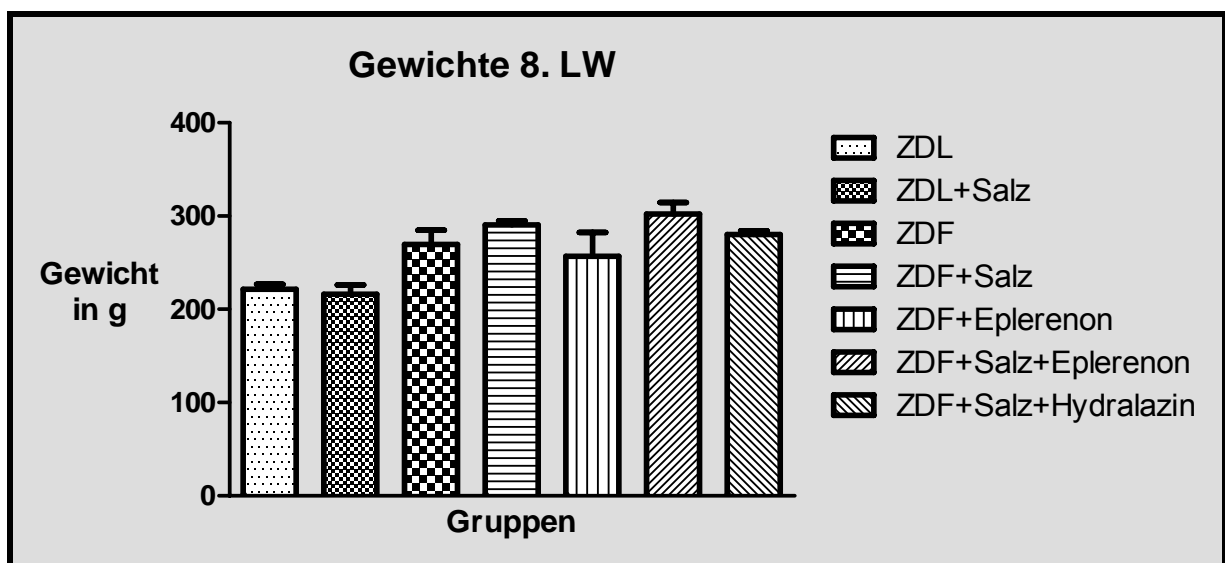


Abbildung 1 Körpergewichte in g in der 8. LW; ANOVA $p=0,0018$

In den ersten drei Wochen des Versuchs gab es bei allen Tieren ausgeprägte Gewichtszunahmen. Die Kontrolltiere legten in diesem Zeitraum durchschnittlich 27 ± 2 g pro Woche zu, bei den diabetischen Tieren fanden sich wöchentliche Gewichtszunahmen von 25 ± 3 g. Die Wachstumskurve flachte bei den kranken Tieren bereits im Alter von 10–12 Lebenswochen allmählich ab, um sich dann auf einem Plateau einzupendeln. Bei den ZDL-Kontrollen war dies erst ab der 15. Lebenswoche der Fall.

Die ausgewachsenen Tiere erreichten in der 24. Woche ein Endgewicht zwischen 295 ± 10 g und 343 ± 7 g, ohne statistisch signifikante Unterschiede bezüglich der Gruppenzugehörigkeit (ANOVA $p=0,5843$).

Ergebnisse

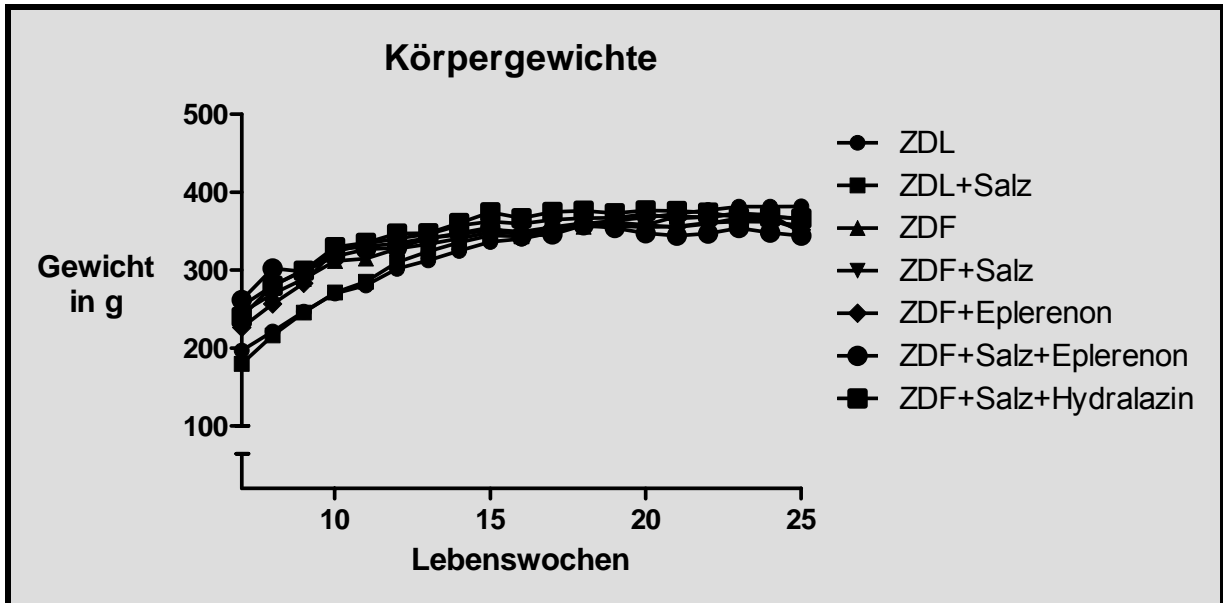


Abbildung 2 Entwicklung der Körpergewichte in g über die Versuchsdauer von 14 Wochen;

ANOVA $p=0,4198$

3.1.2 Herzgewicht

Das absolute Herzgewicht zeigte keine gruppenspezifischen Unterschiede.

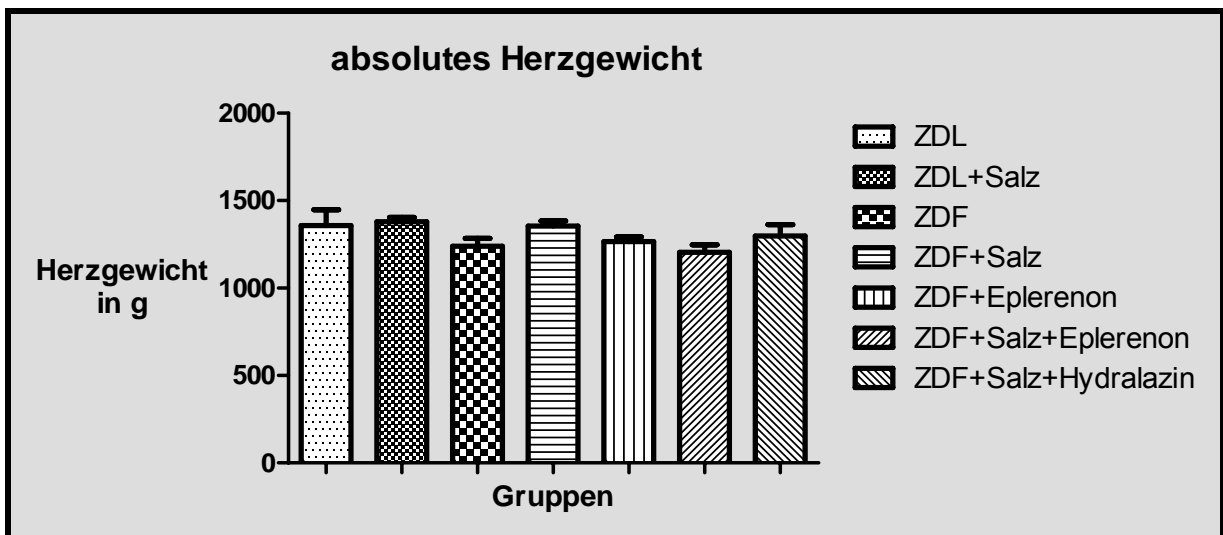


Abbildung 3 Absolutes Herzgewicht der Tiere in g; ANOVA $p=0,1428$

Da das Herzgewicht auch mit der individuellen Größe des jeweiligen Tieres korreliert, wurde das linksventrikuläre Gewicht ins Verhältnis zur Tibialänge gesetzt.

Ergebnisse

Bei dieser Normierung des linksventrikulären Gewichts auf die Tibialänge ist eine signifikante kardiale Hypertrophie der diabetischen Tiere unter nutritiver Salzbelastung nachweisbar. Bei gesunden Kontrolltieren besteht ebenfalls eine Tendenz zur Hypertrophie, diese war jedoch statistisch nicht signifikant. Die Hypertrophieentwicklung lässt sich durch Behandlung der Hochsalz-Tiere mit Eplerenon teilweise verhindern. Dieser Effekt war in unserer Studie jedoch statistisch nicht signifikant.

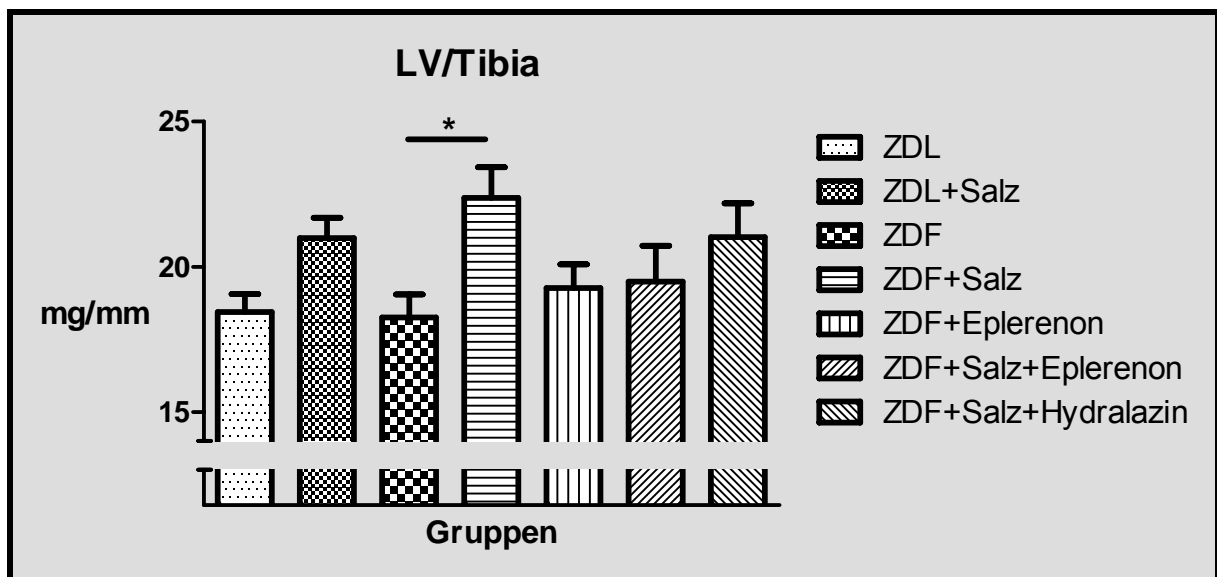


Abbildung 4 Linksventrikuläres Gewicht bezogen auf Tibialänge in mg/mm; ANOVA $p=0,0212$

* ZDF vs. ZDF + Salz $p<0,05$

3.1.3 Blutzucker

Wie in Abb. 5 erkennbar, war bereits in der neunten Lebenswoche der Blutzucker der ZDF-Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich erhöht. Zu diesem Zeitpunkt lag die Blutglucosekonzentration der ZDF-Tiere bei 269 ± 51 mg/dl, die der ZDL-Tiere bei 81 ± 6 mg/dl (ANOVA $p<0,001$). Die Werte der diabetischen Tiere stiegen weiterhin kontinuierlich an, um sich dann ab der 14. Lebenswoche auf dem endgültigen Niveau von 377 ± 22 mg/dl (ZDF) einzupendeln.

Ergebnisse

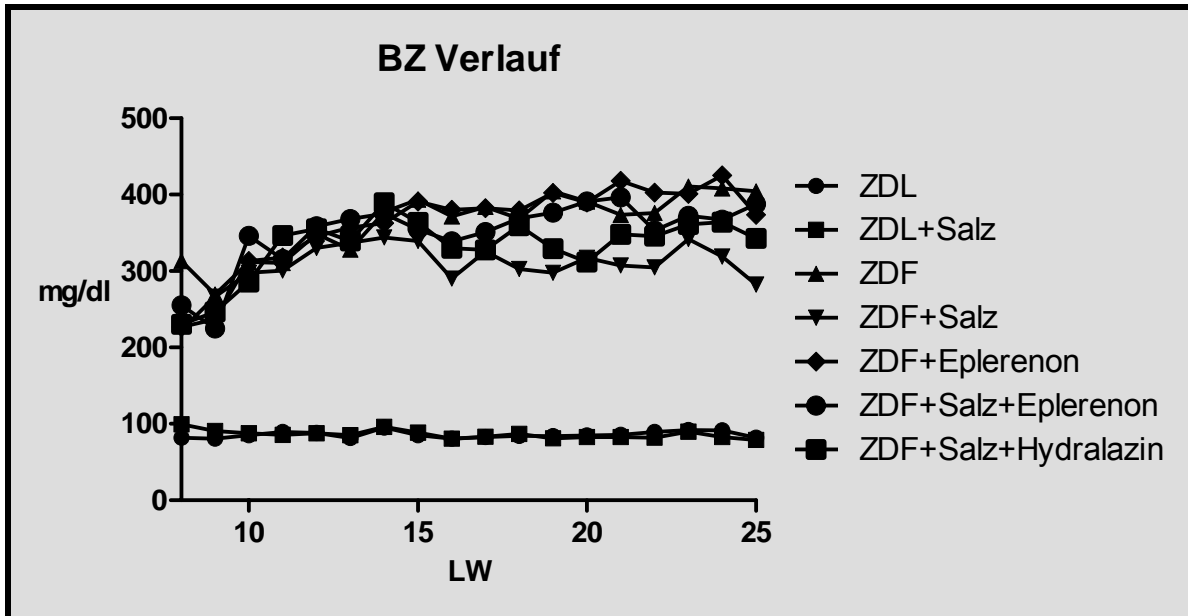


Abbildung 5 Blutglucosekonzentration in mg/dl im Versuchsverlauf; ANOVA $p < 0,0001$

Ein Vergleich der AUC der Blutzucker-Werte von Beginn der Medikamenten – bzw. Salzverabreichung bis zum Versuchsende hinweg zeigte deutliche Unterschiede. Hier zeigten sich erwartungsgemäß massiv erhöhte Blutglucosekonzentrationen bei den kranken Tieren verglichen mit nicht diabetischen Kontrollen.

Die Beimischung von Salz zum Futter führt bei diabetischen Tieren zu einem niedrigeren Blutzuckerspiegel im Vergleich zu den Tieren mit normalem Salzgehalt der Nahrung. Die Werte der mit Eplerenon behandelten diabetischen Tiere waren ebenfalls signifikant höher als diejenigen der dazugehörigen Salzgruppe (siehe Tab. 8).

Gruppe	ZDL	ZDL+Salz	ZDF	ZDF+Salz	ZDF + Eplerenon	ZDF + Salz + Eplerenon	ZDF + Salz + Hydralazin
MW	771*	759#	3480 Δ	2996	3563 \square	3188	3076
Std.abw.	44	42	186	405	258	506	238
SEM	14	15	62	153	86	160	84

Tabelle 8 AUC der Blutglucosekonzentration über den Versuchsverlauf; ANOVA $p < 0,0001$;

* ZDL vs. ZDF $p < 0,001$; # ZDL + Salz vs. ZDF + Salz $p < 0,001$; Δ ZDF vs. ZDF + Salz $p < 0,01$;

\square ZDF + Eplerenon vs. ZDF + Salz + Eplerenon $p < 0,05$

3.1.4 Blutdruck

Bei der Messung der systolischen Blutdruckwerte zeigten sich deutliche gruppenspezifische Unterschiede (ANOVA $p < 0,0001$).

Die systolischen Blutdruckwerte der ZDF-Tiere waren im gesamten Versuchsverlauf signifikant niedriger als die der nichtdiabetischen Kontrolltiere.

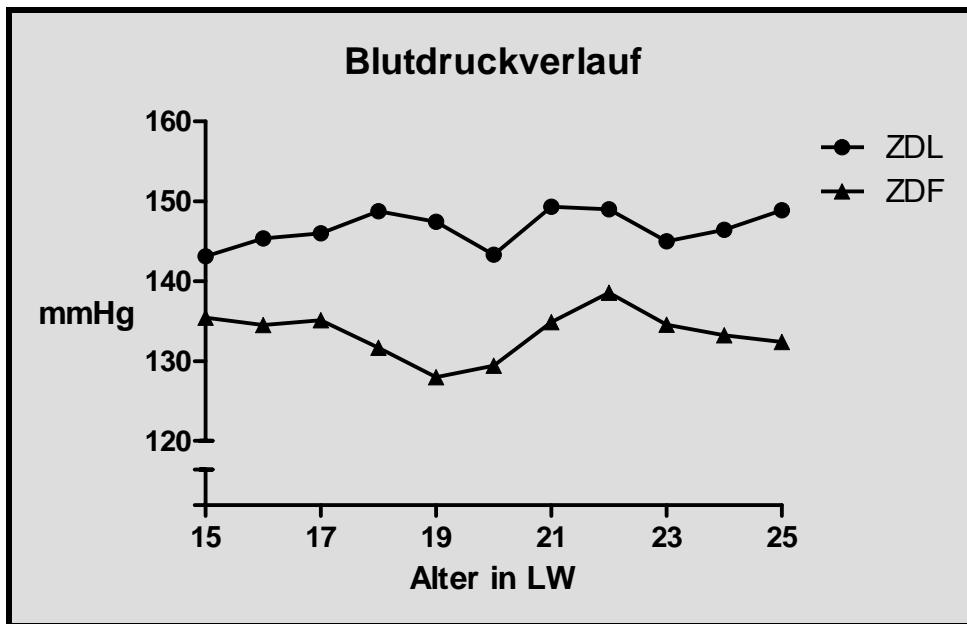


Abbildung 6 Systolische Blutdruckwerte diabetischer und nichtdiabetischer Tiere im Versuchsverlauf ($p < 0,001$)

Hochsalzdiät führte sowohl bei diabetischen Tieren als auch bei den gesunden Kontrollen zu einem signifikanten Blutdruckanstieg (ANOVA $p < 0,001$). Bei kranken Ratten war dieser Anstieg ausgeprägter.

Ergebnisse

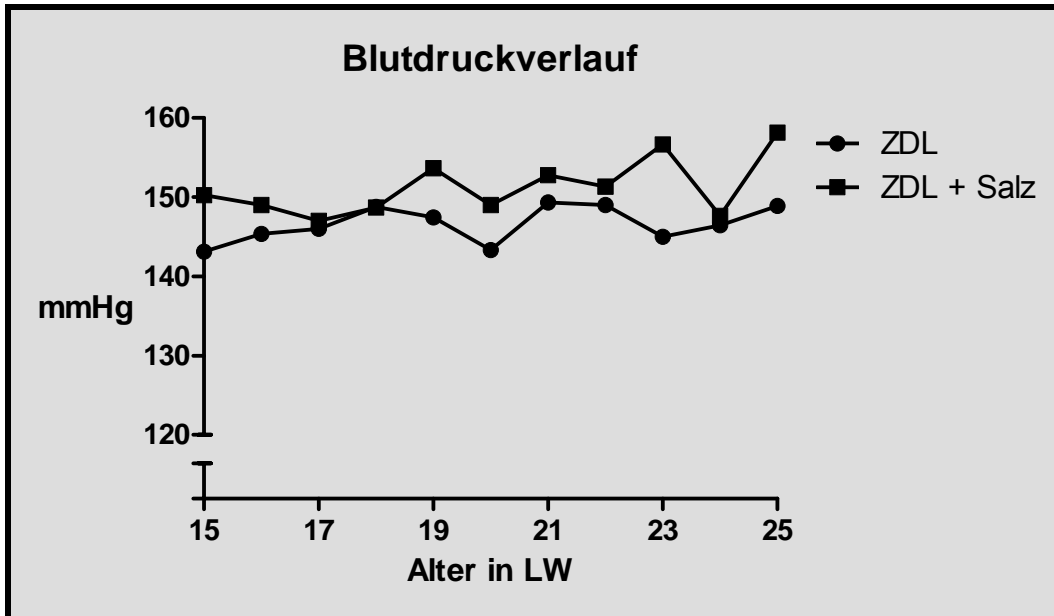


Abbildung 7 Systolische Blutdruckwerte der Kontrollgruppen in mmHg im Versuchsverlauf ($p < 0,05$)

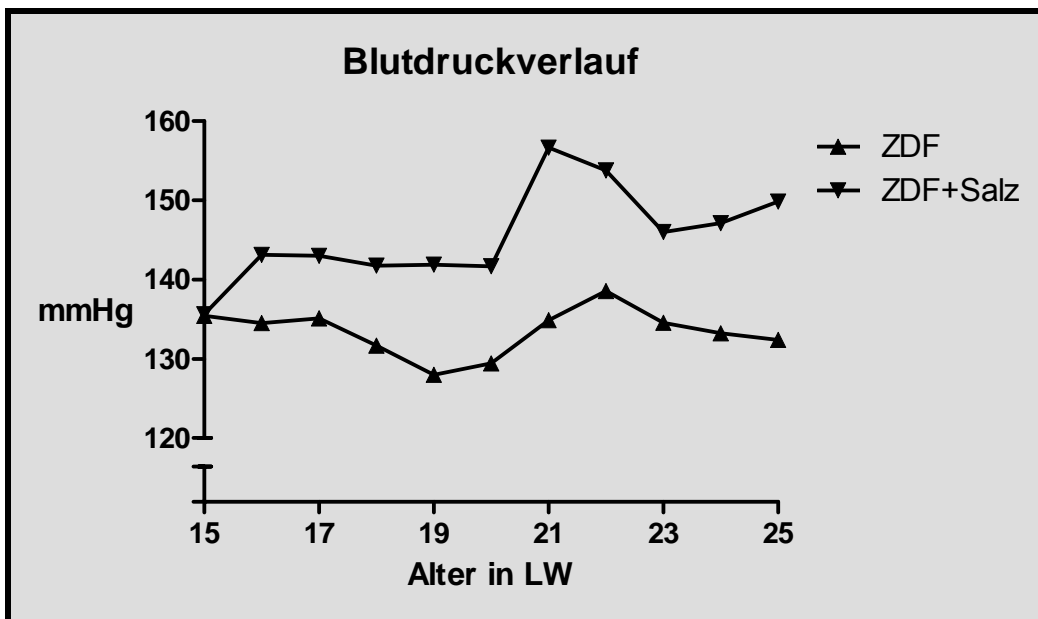


Abbildung 8 Systolische Blutdruckwerte der ZDF- und ZDF + Salz-Tiere in mmHg im Versuchsverlauf ($p < 0,001$)

Ergebnisse

Die Verabreichung von Eplerenon führte bei diabetischen Tieren unter Normalsalzdiät zu keiner statistisch signifikanten Veränderung des systolischen Blutdrucks. Bei der ZDF + Salz + Eplerenon – Gruppe hingegen resultierte die Eplerenon-Therapie in einer signifikanten Senkung des systolischen Blutdrucks im Vergleich zu Tieren mit Hochsalzdiät ohne Eplerenon.

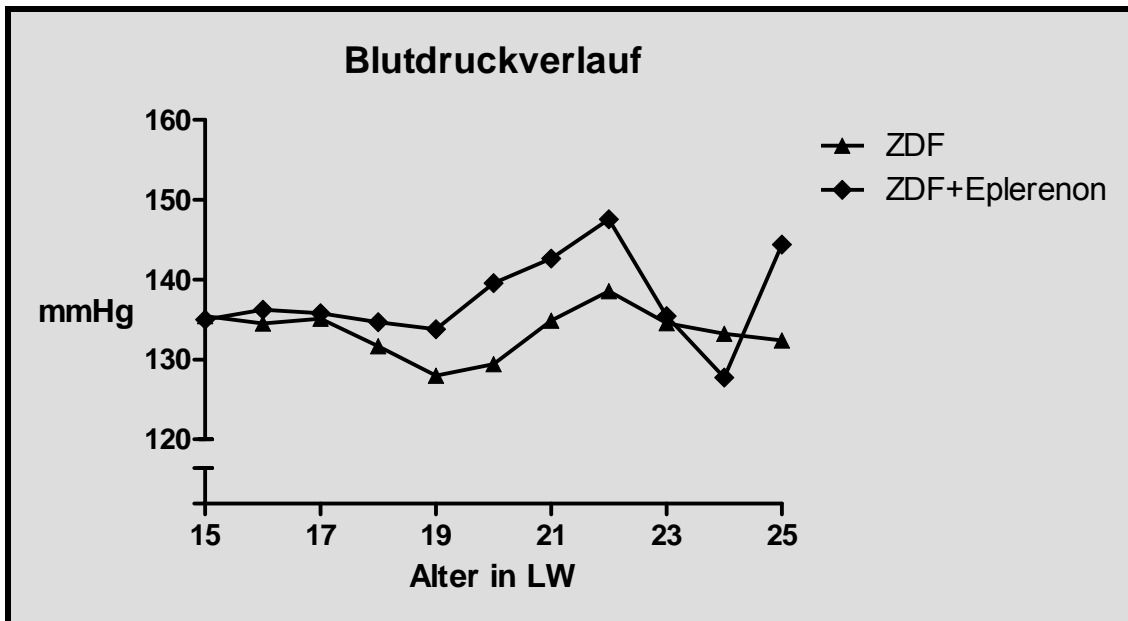


Abbildung 9 Systolische Blutdruckwerte der ZDF- und ZDF + Eplerenon-Tiere in mmHg im Verlauf

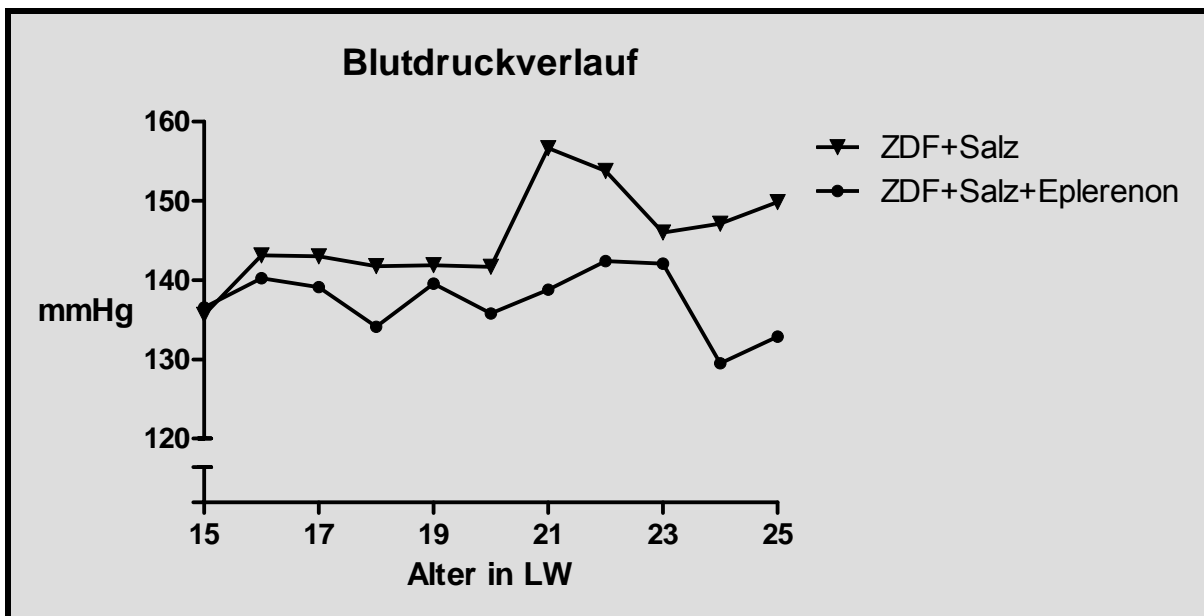


Abbildung 10 Systolische Blutdruckwerte von ZDF + Salz – Tieren mit und ohne Eplerenon in mmHg
($p < 0,001$)

Ergebnisse

Auch die Hydralazinthherapie senkte den systolischen Blutdruck in vergleichbarem Ausmaß ($p < 0,01$). Zwischen den Gruppen ZDF + Salz + Eplerenon und ZDF + Salz + Hydralazin bestand kein wesentlicher Unterschied.

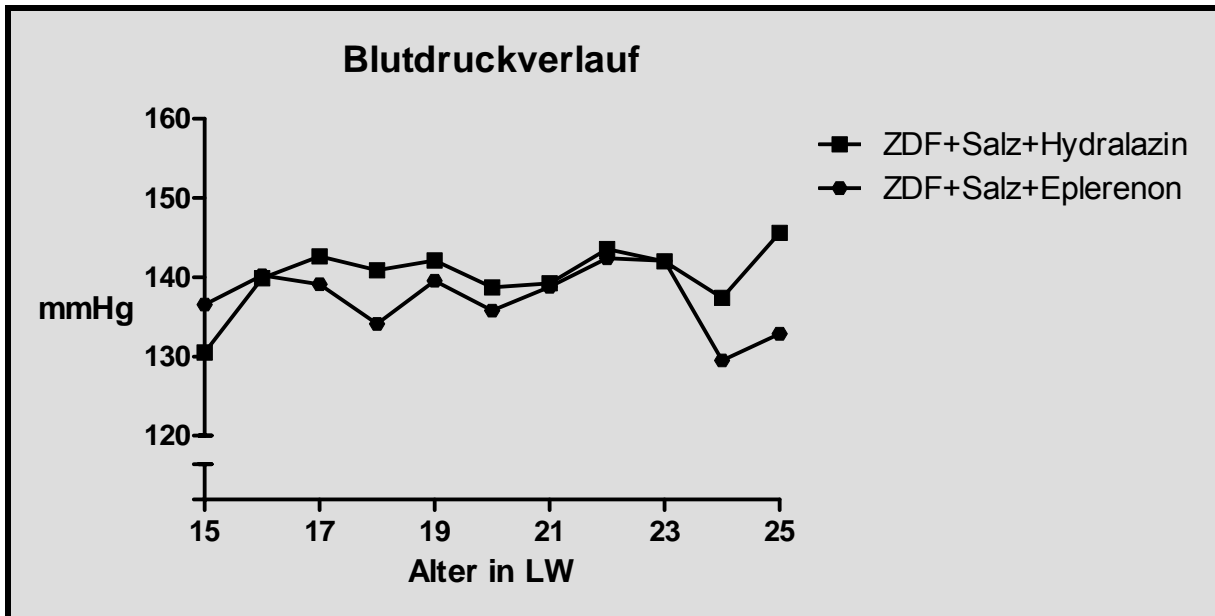


Abbildung 11 Systolische Blutdruckwerte von ZDF-Tieren mit Salz und Eplerenon bzw. Hydralazin

3.1.5 Laufband

Beim Konditionstest auf dem Laufband zeigte sich eine bedeutsame Reduktion der körperlichen Leistungsfähigkeit aller ZDF-Gruppen im Vergleich mit den ZDL-Tieren. Die gesunden Tiere konnten auf dem Laufband wesentlich weitere Strecken zurücklegen als die ZDF-Tiere, bevor sie erschöpft stehen blieben. Die nutritive Salzbelastung hatte hierauf keinen Einfluss. Die Behandlung mit Eplerenon oder Hydralazin führte zu keiner signifikanten Verbesserung der Ausdauer (siehe Abb. 12).

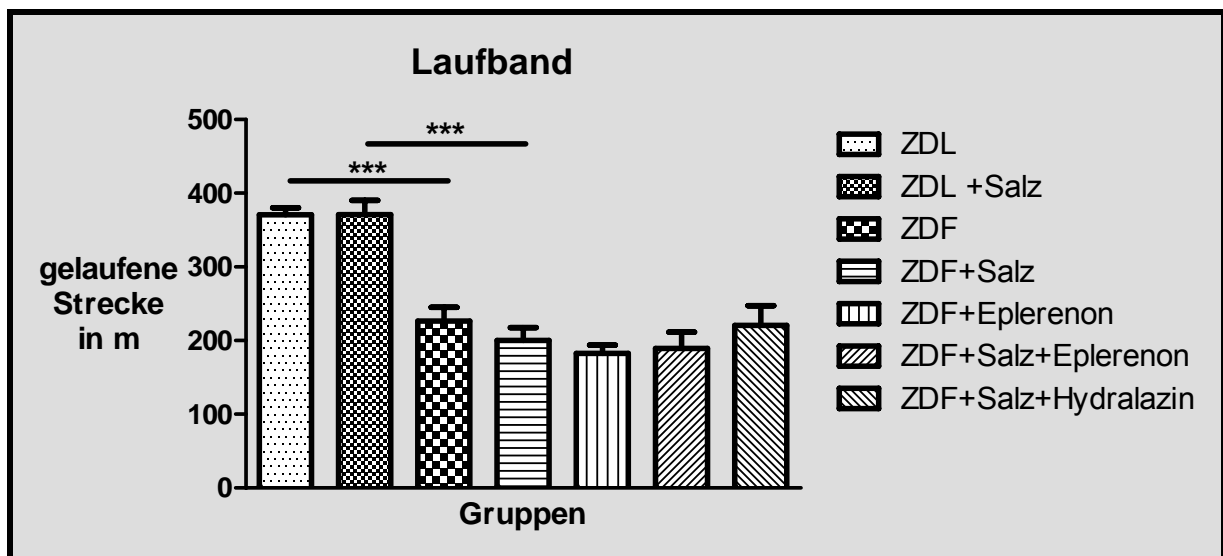


Abbildung 12 Gelaufene Strecke der Tiere während der Laufbandbelastung in m; ANOVA $p < 0,0001$;

*** ZDL vs. ZDF bzw. ZDL + Salz vs. ZDF + Salz $p < 0,001$

3.2 Echokardiographie

In der 24. Lebenswoche wurde eine Echokardiographie in Narkose durchgeführt, um strukturelle Veränderungen des Herzens beurteilen zu können.

3.2.1 Linksventrikulärer innerer diastolischer Diameter

Der linksventrikuläre innere diastolische Diameter war bei allen Gruppen ungefähr gleich groß. Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede ermitteln. Auffallend sind jedoch die unter Salzbelastung eher höheren Werte sowohl bei gesunden als auch bei kranken Tieren im Vergleich zu den entsprechenden unbehandelten Gruppen. Eine Behandlung der salzbelasteten ZDF-Tiere mit Eplerenon führte tendenziell zu niedrigerem LVIDd. Diese Ergebnisse waren jedoch statistisch nicht signifikant.

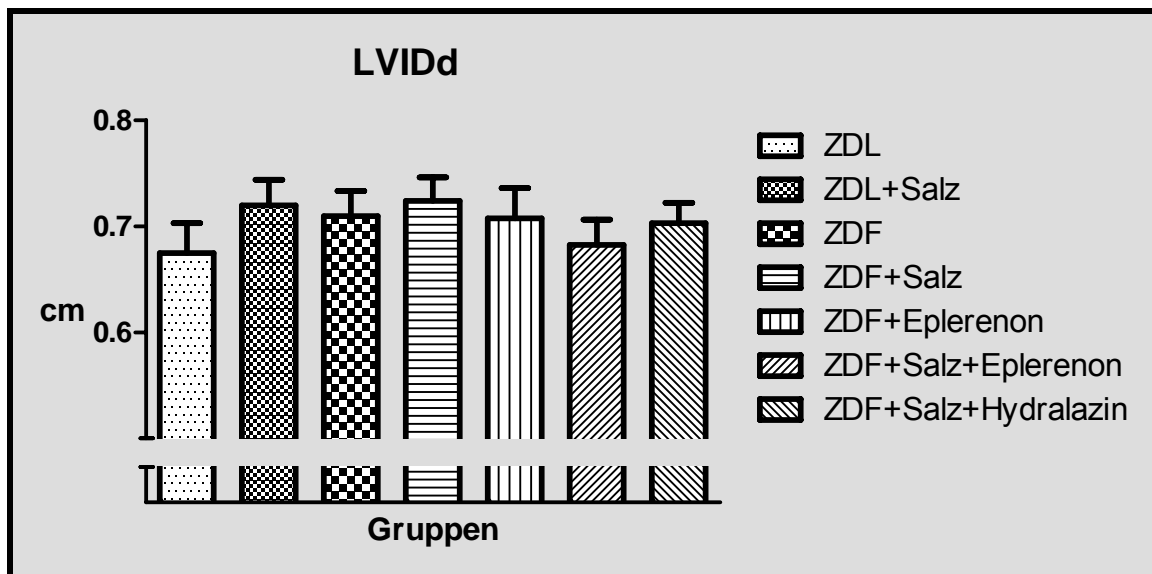


Abbildung 13 Echokardiographisch ermittelter LVIDd in cm; ANOVA p=0,7592

3.2.2 Diastolische Septumdicke

Diabetische Tiere mit Normalsalzdiät zeigten ähnliche Werte bei der Messung der diastolischen Septumdicke wie Kontroll-Tiere. Im Gegensatz hierzu führte nutritive Salzbelastung diabetischer Ratten zu einer Septumhypertrophie. Eine Behandlung mit Eplerenon oder Hydralazin war nicht in der Lage, diesem Effekt ausreichend entgegenzuwirken.

Auch bei fehlender statistischer Relevanz dieser Ergebnisse lässt sich doch zumindest eine Tendenz der kranken Tiere zur Septumhypertrophie postulieren, wenn die Tiere gleichzeitig einer erhöhten Salzzufuhr ausgesetzt waren.

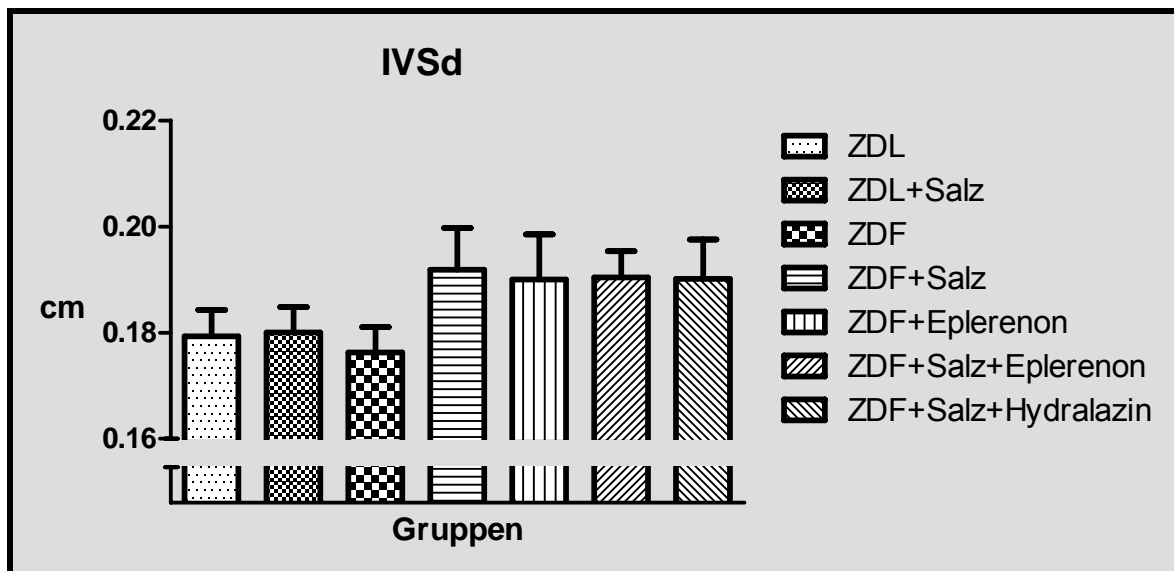


Abbildung 14 Echokardiographisch ermittelte diastolische Septumdicke in cm; ANOVA $p=0,3920$

3.2.3 Fractional Shortening

Beim Vergleich des Fractional Shortening fanden sich keine deutlich ausgeprägten Unterschiede in der Pumpfunktion der diabetischen Tiere im Vergleich zu den gesunden Kontrollen. Weder Krankheit noch Salzbelastung oder Behandlung durch Eplerenon bzw. Hydralazin konnten die Kontraktilität signifikant beeinträchtigen. Allerdings finden sich bei diabetischen Tieren unter Salzbelastung leicht erhöhte Werte. Dieser Effekt zeigt sich unabhängig von einer Behandlung mit Eplerenon oder Hydralazin.

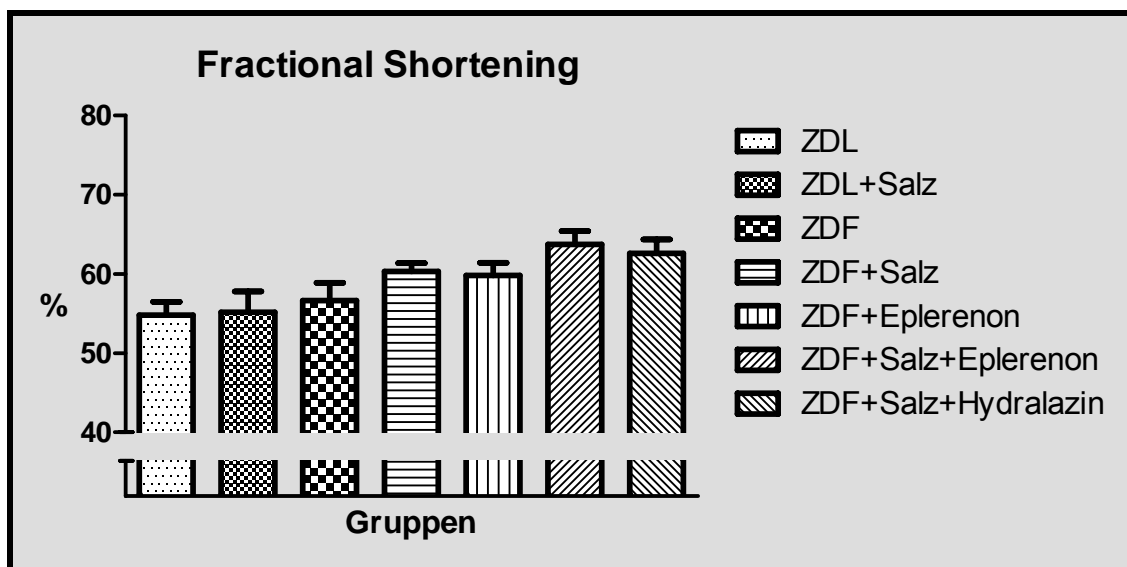


Abbildung 15 Echokardiographisch ermitteltes Fractional Shortening in %; ANOVA $p=0,0043$

3.3 Linksventrikulärer Fibrosegrad

Wie bereits beschrieben, führten wir eine Sirius-Red-Färbung der Paraffinschnitte des linken Ventrikels durch. Diese Schnitte wurden mit Hilfe des Programms Metavue ausgewertet. Gemessen wurde der prozentuale Anteil an intrakardialer Fibrosierung in Bezug auf den gesamten Bildausschnitt.

Hier zeigten die diabetischen Tiere tendenziell mehr Kollagen im Bereich des linken Ventrikels als gesunde Kontrolltiere. Dieser Umbauprozess wird durch salzreiche Diät noch verstärkt, wiederum vor allem bei den kranken Tieren.

Der linksventrikuläre Umbauprozess konnte durch die Gabe von Eplerenon bei salzbelasteten Tieren zum Teil antagonisiert werden. Analog zu den Ergebnissen der Wirkung auf Blutdruck und Herzgewicht hat Eplerenon bei Tieren mit Normalsalzdiät praktisch keinen Einfluss auf das Ausmaß der Fibrosierung im Bereich der linken Herzkammer.

Zwischen den mit Eplerenon und Hydralazin-behandelten Tieren unter Hochsalzdiät besteht ebenfalls kein Unterschied. Alle beschriebenen Ergebnisse waren statistisch nicht signifikant (siehe Abb. 16).

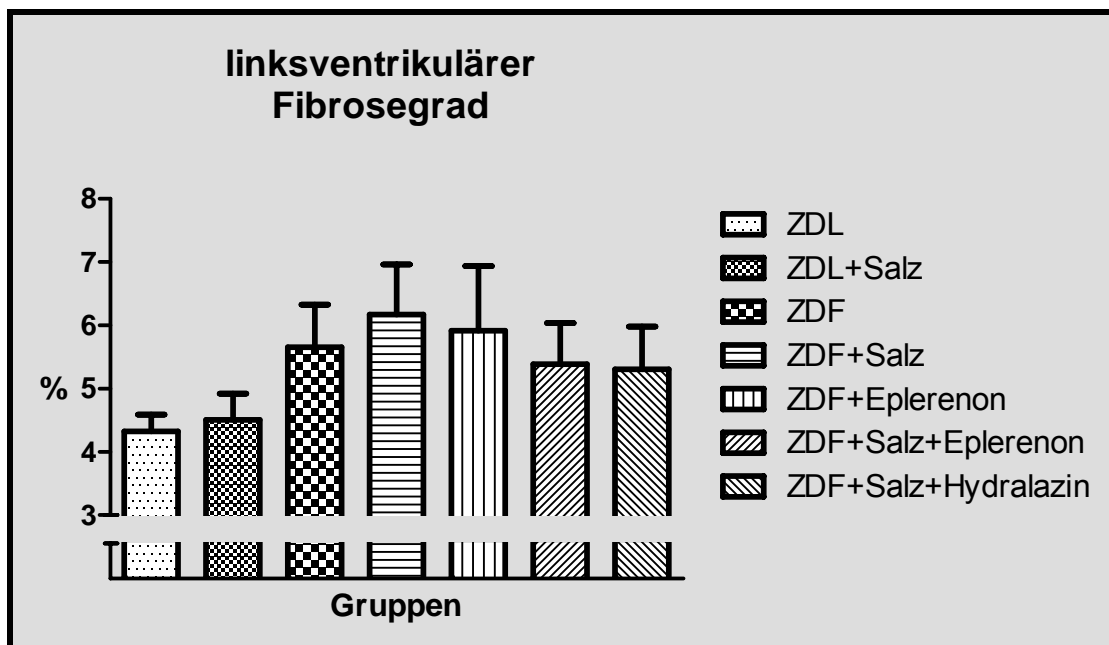


Abbildung 16 Lichtmikroskopisch ermittelter linksventrikulärer Fibrosegrad in Prozent zur Gesamtschnittfläche; ANOVA $p=0,3716$

3.4 Kardiomyozyten-Durchmesser

Im Rahmen der histologischen Untersuchungen wurde auch der Kardiomyozyten-Durchmesser ermittelt. Hierfür wurden an immunhistochemischen Färbungen des linken Ventrikels auf Laminin jeweils 10 Kardiomyozyten ausgemessen und daraus der Mittelwert gebildet.

Es zeigte sich analog zur linksventrikulären Fibrosierung erneut eine Tendenz der diabetischen Tiere zur kardialen Hypertrophie.

Die Durchmesser der Kardiomyozyten bei den diabetischen Tieren waren im Durchschnitt höher als bei der gesunden Kontrollgruppe. Dieser Effekt konnte bei ZDF-Tieren durch Salzdiät noch verstärkt werden, auf gesunde Tiere hatte eine erhöhte nutritive Salzbelastung jedoch keinen Einfluss.

Eplerenontherapie konnte bei Tieren mit Hochsalzdiät die Myokardhypertrophie zumindest teilweise antagonisieren, bei Normalsalzdiät hingegen hatte Eplerenon diesbezüglich keinerlei Wirkung.

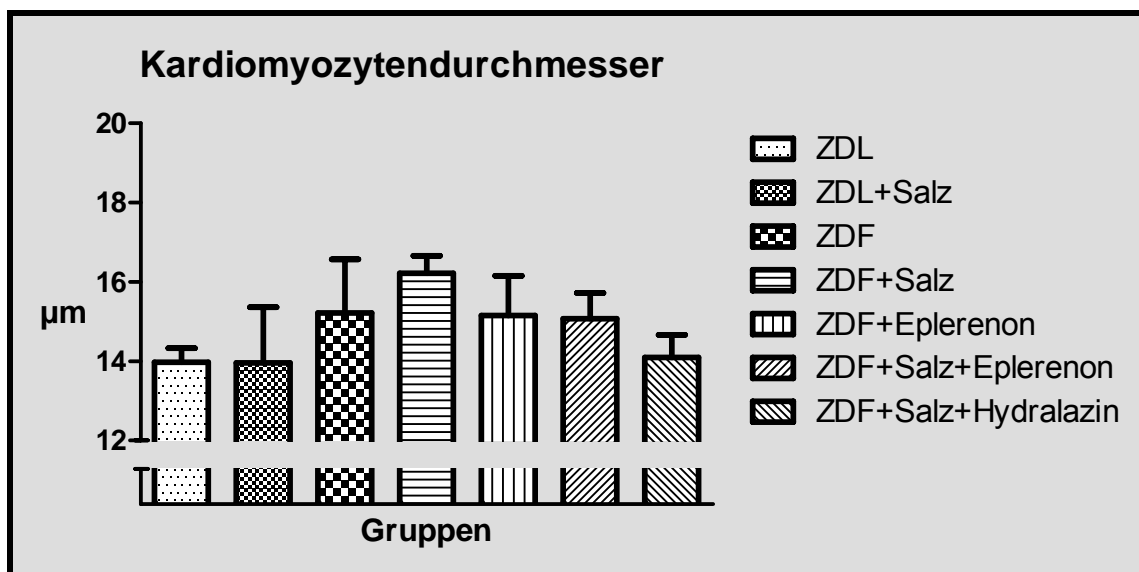


Abbildung 17 Immunhistochemisch ermittelte Kardiomyozytendurchmesser in µm; ANOVA p=0,5356

Ergebnisse

3.5 Analysen im Blutserum

Im Blutserum wurden Natrium und Kalium, sowie die Zusammensetzung der Blutfette analysiert (siehe Tab. 9).

Gruppe	ZDL	ZDL + Salz	ZDF	ZDF + Salz	ZDF + Eplerenon	ZDF + Salz + Eplerenon	ZDF + Salz + Hydralazin
Natrium (mmol/l)	140.3 ± 4.9	145.1 ± 3.3	130.8 ± 4.0	144.3 ± 2.8	136.1 ± 4.9	141.0 ± 1.7	138.7 ± 3.8
Kalium (mmol/l)	11.5 ± 1.5	7.9 ± 0.4	10.2 ± 1.1	8.3 ± 0.5	10.1 ± 1.1	9.9 ± 0.5	9.0 ± 0.6
Gesamtcholesterin (mg/dl)	85.1 ± 5.7*	87.1 ± 5.3	143.2 ± 9.9	167.6 ± 10.1Δ	150.6 ± 12.1	163.7 ± 8.3□	197.4 ± 9.3
HDL (mg/dl)	25.0 ± 1.8+	18.9 ± 7.4	52.0 ± 4.2	58.3 ± 4.5	50.1 ± 5.5	58.8 ± 2.5	67.6 ± 5.3
LDL (mg/dl)	5.8 ± 1.7	7.4 ± 1.5	10.6 ± 4.2	17.0 ± 2.4	12.4 ± 3.6	12.9 ± 2.5	18.9 ± 3.9
Triglyceride (mg/dl)	190.5 ± 19.0#	128.3 ± 27.9	467.1 ± 36.6	591.3 ± 74.7×	478.1 ± 48.5	463.7 ± 48.3☼	943.7 ± 137.2
VLDL (mg/dl)	54.4 ± 3.2△	52.4 ± 3.0	80.9 ± 5.2	92.2 ± 4.8▶	88.1 ± 6.7	91.6 ± 5.0◇	111.6 ± 4.8

Tabelle 9 Übersicht über die Serumelektrolyte und -lipide; ANOVA p-Werte: Natrium p=0,1123;

Kalium p=0,1111; Gesamtcholesterin p<0,0001; HDL p<0,0001; LDL p=0,0384; Triglyceride p<0,0001; VLDL p<0,0001;

Gesamtcholesterin: * ZDL vs. ZDF p<0,001; □ ZDF + Salz + Eplerenon vs. ZDF + Salz + Hydralazin p<0,05; Δ ZDF + Salz vs. ZDF + Salz + Hydralazin p<0,05;

HDL: + ZDL vs. ZDF p<0,001;

Triglyceride: # ZDL vs. ZDF p<0,01; ☼ ZDF + Salz + Eplerenon vs. ZDF + Salz + Hydralazin p<0,001; × ZDF + Salz vs. ZDF + Salz + Hydralazin p<0,001;

VLDL: △ ZDL vs. ZDF p<0,001; ◇ ZDF + Salz + Eplerenon vs. ZDF + Salz + Hydralazin p<0,05; ▶ ZDF + Salz vs. ZDF + Salz + Hydralazin p<0,01

Bei der Analyse der Elektrolyte gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Auffallend ist, dass das Serum-Natrium unter Hochsalzdiät ansteigt. Dieser Effekt ist bei diabetischen Tieren ausgeprägter als bei Gesunden.

Das Gesamtcholesterin im Serum war bei den gesunden Kontrolltieren deutlich niedriger als bei den ZDF-Tieren. Die Verabreichung von Salz führte hier zu

Ergebnisse

keiner Veränderung. Ferner beeinflusste auch die Behandlung mit Eplerenon die Hypercholesterinämie nicht, weder bei salzbelasteten Tieren noch bei Tieren ohne Salzdiät. Im Gegensatz hierzu führte die Behandlung mit Hydralazin zu einem augenfälligen Anstieg des Serum-Cholesterins bei Tieren mit nutritiver Salzbelastung.

Die Betrachtung der HDL-Fraktion der Cholesterine ergab ähnliche Verhältnisse. Die HDL-Konzentration im Serum war bei den Kontrolltieren im Vergleich zu den kranken Tieren signifikant niedriger. Wiederum fanden sich keine Unterschiede zwischen Tieren mit nutritiver Salzzufuhr und Tieren mit Normalsalzdiät. Weder die Behandlung mit Eplerenon noch mit Hydralazin führte zu einer Beeinflussung der HDL-Serumkonzentration.

Bei den Triglyceriden hingegen war der Unterschied besonders eindrücklich. Auch hier zeigten die Kontrolltiere deutlich niedrigere Werte als die kranken Tiere. Die Gabe von Salz veränderte auch in diesem Fall den Serum-Triglyceridspiegel nicht signifikant. Während die Behandlung der Tiere mit Eplerenon hier ebenfalls keine Veränderung verursachte, weder bei salzbelasteten Tieren noch bei Tieren mit Normalsalzdiät, stieg der Serumgehalt an Triglyceriden bei Behandlung der Tiere mit Hydralazin deutlich an.

Die Analyse der LDL-Fraktion der Cholesterine zeigte bei ZDF-Tieren höhere Werte als bei gesunden Kontrolltieren. Wiederum waren die Werte bei kranken Tieren mit nutritiver Salzbelastung unter Hydralazintherapie im Vergleich zur Eplerenontherapie deutlich erhöht.

Bei der Betrachtung von VLDL konnte festgestellt werden, dass die gesunden Tiere im Vergleich mit den Kranken deutlich niedrigere Serumkonzentrationen aufwiesen. Auch hier führte Salzbelastung zu keiner Veränderung der Werte, weder bei gesunden Kontrollen noch bei ZDF-Tieren. Ebenso wenig konnte die Behandlung der Tiere mit Eplerenon eine Veränderung des Serum-VLDL bewirken. Analog zu den Triglyceriden ergab der Einsatz von Hydralazin signifikant höhere Werte im Vergleich zu unbehandelten salzbelasteten Ratten.

3.6 RIA

3.6.1 ANP im linken Ventrikel

Bei der Betrachtung der ANP-Konzentration im linken Ventrikel zeigte sich, dass die Ausgangswerte bei den diabetischen Tieren deutlich höher liegen. Die Daten waren im One-way-ANOVA zwar signifikant, der Vergleich der für die Fragestellung relevanten Untergruppen ergab jedoch keine sinnvollen statistisch signifikanten Ergebnisse.

Ein Vergleich der Gruppen ZDL und ZDF mittels t-Test zeigte hingegen ein signifikantes Ergebnis ($p < 0,05$). Salzbelastung, Eplerenon oder Hydralazin hatten weiterhin keinen Einfluss auf die linksventrikuläre Konzentration von ANP.

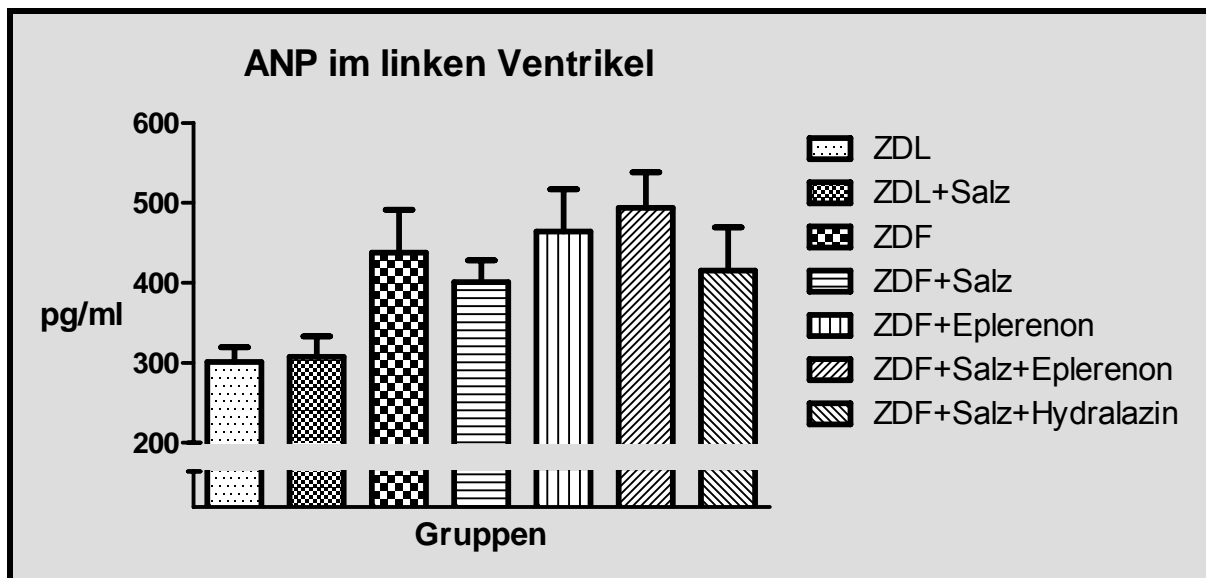


Abbildung 18 ANP-Konzentration im linken Ventrikel in pg/ml, ermittelt mittels RIA; ANOVA $p=0,0098$

3.6.2 BNP im linken Ventrikel

Bei Analyse der BNP-Konzentration im linken Ventrikel fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen. Tendenziell zeigten sich bei ZDF-Tieren etwas höhere Werte, die aber ansonsten völlig unabhängig waren von Stoffwechsellage, nutritiver Salzzufuhr und Behandlung der Tiere mit Eplerenon oder Hydralazin.

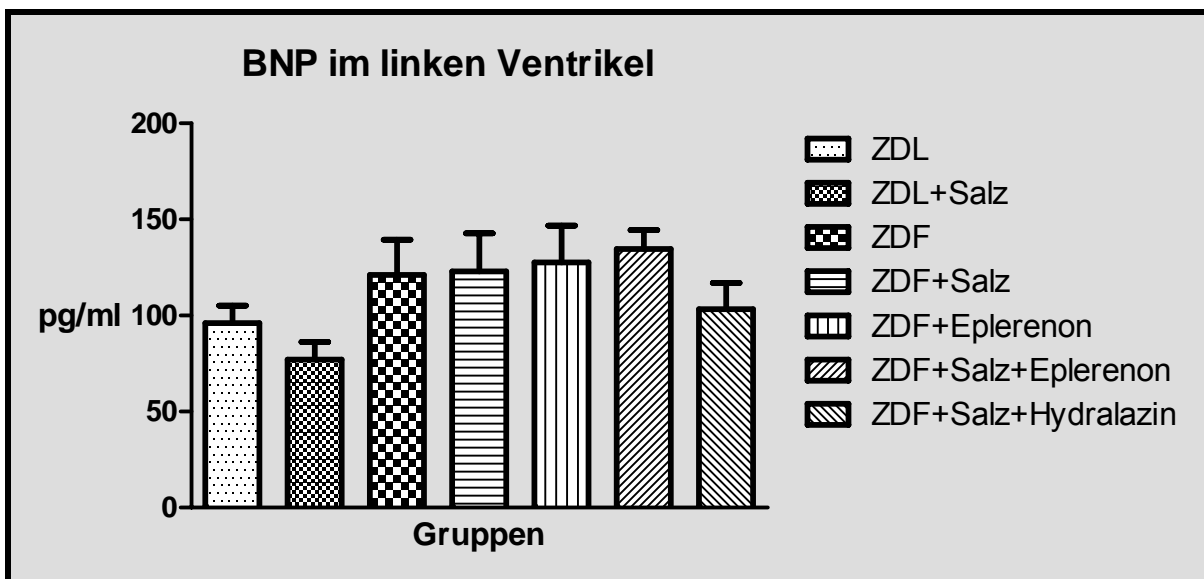


Abbildung 19 BNP-Konzentration im linken Ventrikel in pg/ml, ermittelt mittels RIA; ANOVA $p=0,0978$

3.7 Taqman-PCR

3.7.1 ANP-mRNA im linken Ventrikel

Hier ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. ZDF-Tiere zeigten eine tendenzielle (statistisch nicht signifikante) Erhöhung der linksventrikulären ANP-Expression im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren. Auffallend ist, dass der Gehalt an ANP-mRNA bei den Tieren mit Hochsalzdiät im Vergleich zu den Normalsalz-Tieren leicht erniedrigt war. Bei den diabetischen Tieren war dieser Effekt ausgeprägter als bei den gesunden Kontrolltieren. Mit Eplerenon oder Hydralazin behandelte Tiere zeigten in etwa die gleichen Werte wie unbehandelte ZDF-Tiere.

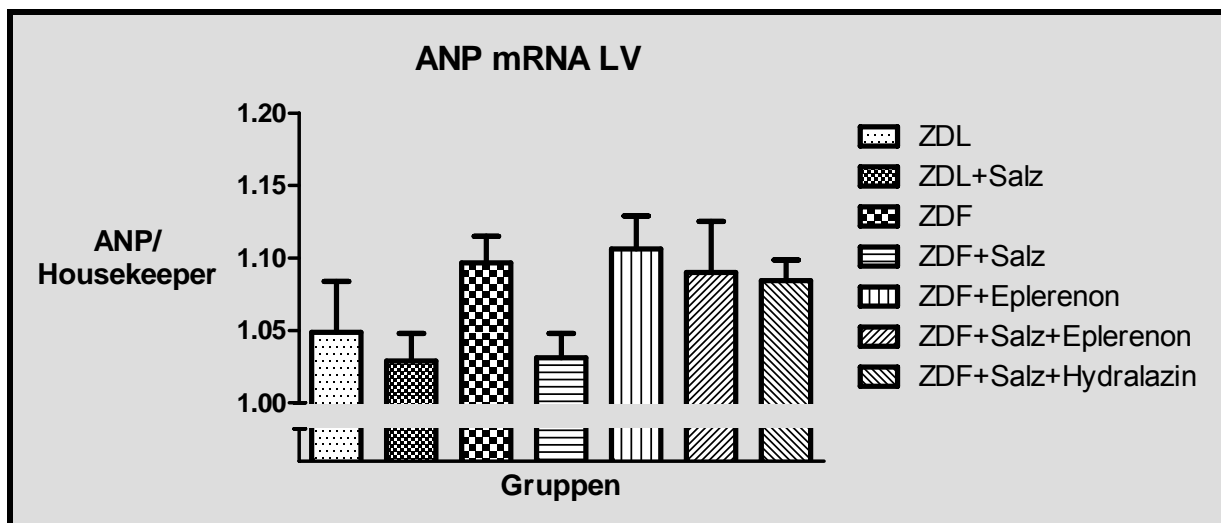


Abbildung 20 mRNA-Quantifizierung mittels Taqman-PCR; Angabe in Bezug auf Housekeeper (Calsequestrin-2); ANOVA $p=0,1240$

3.7.2 BNP-mRNA im linken Ventrikel

Die mRNA-Konzentration von BNP im linken Ventrikel war bei ZDF-Tieren im Vergleich mit gesunden Kontrolltieren ein wenig erhöht. Eine Hochsalzdiät hatte keinen Einfluss auf die linksventrikuläre BNP-Expression, weder bei ZDL- noch bei diabetischen Tieren. Ebenso wenig ergaben sich signifikante Veränderungen der Werte bei Eplerenon- oder Hydralazin-behandelten Tieren.

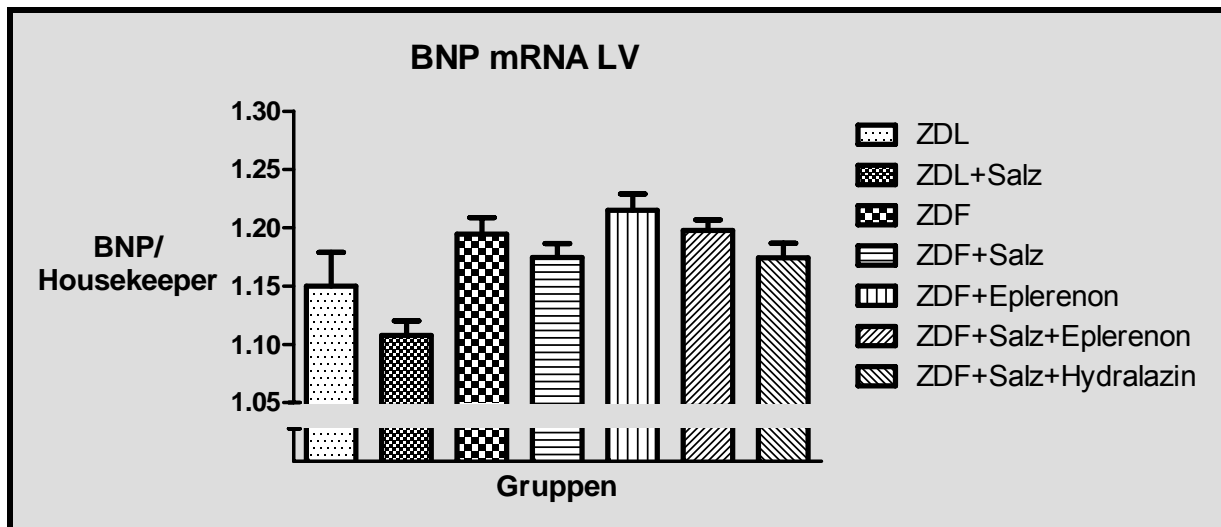


Abbildung 21 mRNA-Quantifizierung mittels Taqman-PCR; Werte in Bezug auf Housekeeper (Calsequestrin-2); ANOVA $p=0,0002$

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von nutritiver Salzbelastung und Aldosteron-Antagonisierung auf die kardiale Endorganschädigung an einem klinisch relevanten Modell des metabolischen Syndroms zu demonstrieren. Der Einfluss von Hyperaldosteronismus und Hochsalzbelastung auf die entstehenden Umbauvorgänge sollten sowohl unabhängig voneinander als auch in Kombination untersucht werden. Darüber hinaus sollte die direkte rezeptorvermittelte Wirkung des Aldosteronantagonisten Eplerenon im Zielgewebe von der indirekten Wirkung durch systemische Blutdrucksenkung abgegrenzt werden. Als etabliertes Tiermodell diente hierzu die adulte männliche Zucker Diabetic Fatty Rat.

Endemann et al. führten bereits 2004 an SHRSP-Ratten einen ähnlichen Versuch durch. Hier zeigte sich ein salzabhängiger Blutdruckanstieg, der durch Eplerenon weitgehend antagonisiert werden konnte. Weiterhin verhinderte Eplerenon die salzinduzierte Zunahme des Herzgewichts sowie die ebenfalls durch Salzüberladung verursachte kardiale Fibrosierung. Die genannten Wirkungen des Aldosteron-Antagonisten Eplerenon konnten bei Tieren unter Normalsalzdiät nur in abgeschwächter Weise beobachtet werden [42].

In vorliegendem Versuch sollte nun geprüft werden, ob diese Salzabhängigkeit der Aldosteronwirkung auch bei ZDF-Ratten, einem Modell des metabolischen Syndroms, nachzuweisen ist.

Hypothese 1: Das Vorliegen eines hyporeninämischen Hyperaldosteronismus führt bei ZDF-Ratten zu kardialer linksventrikulärer Fibrosierung. Diese ist wesentlich ausgeprägter bei Tieren unter gleichzeitiger nutritiver Salzbelastung.

In einem vorangegangenen Versuch unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass bei der ZDF-Ratte, einem Tiermodell des metabolischen Syndroms, erhöhte Plasma- und Urin-Aldosteronspiegel vorliegen. Gleichzeitig ist bei diesen Tieren der Renin-Spiegel im Plasma erniedrigt, es handelt sich also um einen hyporeninämischen Hyperaldosteronismus. Die Tatsache, dass sowohl der Plasma-Renin-Spiegel als auch die Plasma- und Urin-Aldosteronspiegel durch die Verabreichung von ACE-Inhibitoren normalisiert werden können, zeigt, dass die erhöhte Produktion von Aldosteron bei ZDF-Tieren zumindest teilweise durch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System vermittelt wird [17].

Erhöhte Serum-Aldosteronspiegel können eine Fibrosierung im Bereich verschiedener Endorgane induzieren, vor allem in Herz, Nieren und dem vaskulären System [27, 61-66]. Bereits 1992 konnten Brilla et al. zeigen, dass Aldosteron-Infusion bei einseitig nephrektomierten Ratten zur kardialen Hypertrophie führt. Dies geschah vorwiegend bei Tieren, die gleichzeitig einer nutritiven Salzbelastung ausgesetzt waren. Bei Tieren mit Niedrigsalzdiät blieben diese Effekte trotz teilweise noch höheren Aldosteron-Spiegeln jedoch aus. So lag die Vermutung nahe, dass für die Entwicklung der Endorganhypertrophie nicht die absoluten Plasma-Spiegel entscheidend sind, sondern vor allem das Verhältnis von Plasma-Aldosteron zu nutritiver Salzbelastung eine ausschlaggebende Rolle spielt [27]. Verschiedene weitere Studien bestätigten diese Beobachtungen [24, 28, 62].

In der Studie von Endemann et al. an Stroke-Prone-Spontaneously-Hypertensive-Rats (SHRSP), einem Modell genetischer Hypertonie, wurde bei Tieren unter Hochsalzdiät ein signifikant höheres Herzgewicht im Verhältnis zum Körpergewicht festgestellt. Es bildete sich eine salzinduzierte kardiale Hypertrophie [42]. Dieser Zusammenhang zwischen Hochsalzdiät und kardialer Hypertrophie wurde u.a. von Susic et al. an spontan-hypertensiven Ratten bestätigt [67]. Bei ZDF-Ratten liegen diesbezüglich bisher noch keine Daten vor.

Diskussion

In unserer Studie weisen wir auch bei diabetischen ZDF-Tieren unter nutritiver Salzbelastung einen signifikanten Anstieg der Herzgewichte (normiert auf die Tiabiallänge) nach. Bei den gesunden Kontrolltieren waren die Herzgewichte unter Hochsalzdiät zwar ebenfalls höher, der Unterschied war jedoch weniger ausgeprägt (keine statistische Signifikanz). Eine Behandlung der salzbelasteten ZDF-Tiere mit Eplerenon führte zu einer Abnahme der Aldosteron-vermittelten kardialen Hypertrophieentwicklung. Aufgrund der geringen Anzahl der Versuchstiere ergab sich jedoch keine statistische Signifikanz (siehe 3.1.2).

In der Echokardiographie beobachteten wir eine Tendenz (keine statistische Signifikanz) der diabetischen Tiere zu Septumhypertrophie, vor allem in Kombination mit nutritiver Salzbelastung (siehe 3.2.2). Im Gegensatz zum Herzgewicht konnte unter Salzerziehung bei gesunden Tieren hier kein Unterschied dargestellt werden. Weiterhin zeigten ZDF-Ratten unter Salzdiät eine leichte Zunahme der kardialen Kontraktilität (keine Signifikanz). Dieser Effekt ist möglicherweise als Kompensationsmechanismus bei kardialer Volumenbelastung zu deuten.

Bei der mikroskopischen Untersuchung des linksventrikulären Fibrosegrades konnten ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede ermittelt werden. Eine genaue Betrachtung aller vorliegenden Daten zeigt jedoch eine Tendenz der diabetischen Tiere zur vermehrten Kollageneinlagerung in das Myokard. Dieser Effekt wird durch nutritive Salzbelastung zusätzlich noch verstärkt. Bei gesunden Tieren war kein nachteiliger Einfluss der Salzerziehung nachweisbar. Bei vergleichbarer Versuchsanordnung konnte die Arbeitsgruppe um Endemann et al. an SHRSP-Ratten eine unter Salzbelastung signifikant vermehrte interstitielle Kollageneinlagerung in sämtlichen Schichten des linken und rechten Ventrikels nachweisen. Dieser Effekt konnte durch Eplerenontherapie verhindert werden [42].

Die kardiale Hypertrophie spiegelt sich auch in den Durchmessern der Kardiomyozyten wider. Auch hier konnten wir bei diabetischen Tieren tendenziell höhere Werte messen, jedoch ohne statistische Signifikanz. Eine Hochsalzdiät führte bei ZDF-Tieren, nicht aber bei ZDL-Tieren, zu einer weiteren Zunahme der Kardiomyozyten-Größe. Dies könnte wiederum, analog zur beobachteten Septumhypertrophie und Hyperkontraktilität, als Kompensationsmechanismus einer vorliegenden Volumenbelastung interpretiert werden. In der Hochsalzgruppe konnte

Diskussion

eine Aldosteronblockade mit Eplerenon diesen Veränderungen zumindest teilweise entgegenwirken.

Den Einfluss von Aldosteron auf Kardiomyozyten untersuchten u.a. Okoshi et al. in vitro an neonatalen Ratten-Kardiomyozyten. Dabei zeigte sich eine signifikante Zunahme der Kardiomyozytengröße unter Aldosteron-Behandlung [68]. In unserem in-vivo-Modell an ZDF-Ratten war dieser Effekt tendenziell ebenfalls nachweisbar (s.o.).

Die Ergebnisse befürworten also durchaus die oben angeführte Hypothese. In unserem Modell des metabolischen Syndroms besteht ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Herzgewicht, Hyperaldosteronismus und nutritiver Salzaufnahme. Mikroskopisch sowie echokardiographisch stellt sich die postulierte profibrotische Wirkung der erhöhten Aldosteronspiegel bei gleichzeitiger Hochsalzdiät zumindest tendenziell dar. Eine Aldosteronblockade mit Eplerenon scheint diesen Veränderungen entgegenzuwirken. Aufgrund der limitierten Anzahl an Versuchstieren sowie deren Verteilung auf die verschiedenen Untergruppen konnte aber ein statistisch signifikanter Zusammenhang nicht dargestellt werden.

Hypothese 2: Eplerenon bzw. Spironolacton verhindert die kardiale Hypertrophie, vor allem bei Tieren unter Salzbelastung.

ACE-Hemmer werden bereits seit längerem bei Patienten mit erhöhtem kardiovaskulärem Risiko erfolgreich zur Reduktion der Komplikationsrate eingesetzt. Eine ACE-Hemmer-Therapie verlängert das Leben insgesamt und senkt die kardiovaskuläre Morbidität, sowie bei Diabetes-Patienten die Häufigkeit des Auftretens Diabetes-assoziiertes Komplikationen [34, 69, 70]. Neben der systemischen Blutdruck-Senkung haben ACE-Hemmer vor allem einen direkten positiven Einfluss auf das kardiale Remodelling [34].

Eine Weiterentwicklung stellen die Aldosteron-Rezeptor-Antagonisten dar. Durch direkte Blockade der Zielrezeptoren wird das bei ACE-Hemmern beobachtete Aldosteron-Escape-Phänomen umgangen. Spironolacton, der erste Vertreter dieser Gruppe, war noch von geringer Selektivität. Durch Wechselwirkungen an Androgen- und Progesteronrezeptoren kommt es unter anderem zu Amenorrhoe, Gynäkomastie und weiteren Nebenwirkungen [31, 71].

Der selektivere Aldosteron-Rezeptor-Blocker Eplerenon weist wesentlich weniger Nebenwirkungen auf. Eplerenon scheint dabei bezüglich des Überlebens herzinsuffizienter Patienten nach Myokardinfarkt der bisherigen medikamentösen Therapie überlegen zu sein (EPHESUS) [39]. In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass Eplerenon die reaktive kardiale Fibrosierung verringert. Dieser Effekt wurde bislang in Modellen des Myokardinfarkts [72, 73], der Hypertension [42, 74], der Herzinsuffizienz [75, 76] sowie der dilatativen Kardiomyopathie [77] aufgezeigt.

Urabe et al. wiesen an Post-Infarkt-Ratten nach, dass die kardioprotektive Wirkung einer Eplerenontherapie unter gleichzeitiger nutritiver Salzbelastung noch ausgeprägter ist. Der Einsatz von Eplerenon führte bei diesen Tieren zu verbesserter kardialer Funktion und geringerer interstitieller sowie perivaskulärer Fibrosierung [78]. An SHRSP-Ratten konnte, wie bereits beschrieben, dieser Effekt ebenfalls nachgewiesen werden [42].

In unserer Studie untersuchten wir an ZDF-Ratten, ob Eplerenon auch das im Rahmen des metabolischen Syndroms auftretende kardiale Remodeling verhindern oder zumindest abschwächen kann. Zusätzlich sollten die Auswirkungen einer Hochsalzdiät auf die Aldosteron-induzierte kardiale Fibrosierung beurteilt werden.

Diskussion

Wie oben beschrieben, war das Herzgewicht bei ZDF-Ratten unter Hochsalzdiät signifikant erhöht. Bei den mikroskopischen und echokardiographischen Untersuchungen zeigten diese Ratten tendenziell höhere linksventrikuläre Fibrosegrade und Septumdicke (siehe 3.2 und 3.3).

Eine Eplerenontherapie zeigte zumindest bei der Hochsalzgruppe einen leichten positiven Effekt auf den linksventrikulären Fibrosegrad (keine statistische Signifikanz). Bezüglich der Septumdicke konnten wir keine Verbesserung unter einer Eplerenontherapie nachweisen.

Die Ergebnisse vorangegangener tierexperimenteller Studien sind bezüglich einer protektiven Wirkung von Eplerenon auf die myokardiale Hypertrophie uneinheitlich. So konnten Susic et al. keine signifikante Verbesserung der linksventrikulären Hypertrophie und Fibrosierung bei salzbelasteten spontanhypertensiven Ratten unter Eplerenontherapie nachweisen [67]. Andere Studien konnten durchaus einen positiven Effekt von Eplerenon beobachten. Bei Guanylat-Cyclase-A-Knock-out-Mäusen (GCA-KO), die aufgrund eines Gendefekts Hypertonie, kardiale Hypertrophie und interstitielle kardiale Fibrosierung entwickeln, konnte die linksventrikuläre Fibrosierung durch Eplerenongabe positiv beeinflusst werden [79]. Ebenso verminderte Eplerenon die myokardiale Fibroseentwicklung bei AT-2-infundierten Mäusen sowie bei an Kardiomyopathie leidenden Hamstern [80, 81].

Zusätzlich untersuchten wir in unserer Studie den Einfluss der nutritiven Salzbelastung auf die Kardiomyozytengröße diabetischer und nichtdiabetischer Tiere. Die Kardiomyozytendurchmesser waren bei den diabetischen Tieren unter Hochsalzdiät am größten. Unter Eplerenontherapie wurden bei diabetischen Tieren unter Salzbelastung Werte gemessen, die jenen nicht-salzbelasteter diabetischer Tiere entsprechen. Dies könnte auf einen möglichen Benefit der Eplerenontherapie hinweisen. Diese Beobachtungen waren aufgrund der kleinen Anzahl an Versuchstieren jedoch statistisch nicht signifikant.

Die Tatsache, dass bei den gesunden Kontrolltieren weder eine relevante linksventrikuläre Fibrosierung noch eine Kardiomyozyten-Hypertrophie unter Hochsalzdiät provoziert werden konnte, könnte für eine salzabhängige profibrotische Wirkung des Hormons Aldosteron sprechen. Auch scheint die Wirkung des selektiven Aldosteron-Rezeptor-Blockers Eplerenon von der Salzzufuhr abhängig zu sein.

Hypothese 3: Hochsalzdiät führt bei ZDF-Ratten zur Blutdrucksteigerung. Dies verstärkt zusätzlich die Entwicklung von kardialer Hypertrophie und Fibrosierung. Durch Aldosteronblockade kann Eplerenon diese Effekte verhindern.

Der Einfluss nutritiver Salzaufnahme auf die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie ist seit längerem bekannt. Mehrere Studien haben gezeigt, dass nutritive Salzaufnahme bei Menschen zu einem Blutdruckanstieg führt [82, 83]. Auch im Tierversuch steigt bei spontan-hypertensiven Ratten der Blutdruck bei zusätzlicher Kochsalzbelastung [42, 84].

In verschiedenen klinischen Studien und epidemiologischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass durch kochsalzarme Diät sowohl bei normotensiven als auch bei hypertensiven Patienten eine Reduktion des Blutdruckes erreicht werden kann. Zur primären Prävention der arteriellen Hypertonie wird deshalb eine kochsalzarme Ernährung empfohlen [85, 86].

Gerade Patienten mit metabolischem Syndrom weisen eine noch ausgeprägtere Salzabhängigkeit des Blutdrucks auf als gesunde Patienten [87]. Die Studien über die Effekte salzreicher Ernährung im Tierversuch bei Zucker Ratten ergaben jedoch keine einheitlichen Ergebnisse. So führte nutritive Salzbelastung in einer Studie von Reddy et al. bei Obese Zucker, nicht aber bei Lean Zucker Ratten, zu einem Anstieg des arteriellen Blutdrucks, wohingegen in einer Studie von Pawloski et al. kein Unterschied zwischen den Blutdruckwerten beider Gruppen zu beobachten war [88, 89]. Eine Reduktion der Kochsalz-Zufuhr bei Obese Zucker Ratten ergab auch nicht die erwartete positive Beeinflussung der vorliegenden arteriellen Hypertonie [90].

Unstrittig ist die Tatsache, dass die Prävalenz der Hypertonie bei Patienten mit metabolischem Syndrom höher ist als in der Normalbevölkerung [91, 92]. Ferner konnte in der 1998 veröffentlichten Studie der UKPDS Study Group nachgewiesen werden, dass bei Diabetes-mellitus-Typ 2-Patienten durch eine Reduktion des Blutdrucks auf einen medianen Wert von 144/82 mmHg das Risiko für Schlaganfall, Diabetes-assoziierte Todesfälle, Herzversagen, mikrovaskuläre Komplikationen und Sehverlust signifikant reduziert werden konnte [93].

Diskussion

Arterielle Hypertonie führt zur weiteren Zunahme der oben bereits beschriebenen salzinduzierten Myokardhypertrophie und –fibrosierung [94], vor allem in Kombination mit erhöhten Aldosteronspiegeln, wie sie bei ZDF-Ratten vorliegen [27, 17].

Die Entwicklung dieser salzinduzierten Hypertrophie und Fibrosierung im Bereich des Myokards konnte in verschiedenen Tiermodellen erfolgreich durch Behandlung der Tiere mit Aldosteron-Antagonisten verhindert werden: bei SHRSP-Tieren verhinderte Eplerenon zum einen die Entwicklung einer Hypertonie bei Tieren unter nutritiver Hochsalzbelastung (mit wenig Wirkung auf Niedrigsalz- und Kontrolltiere) und verbesserte zum anderen auch die entstehende myokardiale Hypertrophie und Fibrosierung [42].

Auch bei Sprague-Dawley-Ratten führte die Kombination aus exogener Aldosteron-Zufuhr und Salzbelastung zu einer perivaskulären Entzündungsreaktion mit arterieller Hypertonie und Fibrosierung. Diese Effekte waren durch Applikation von Spironolacton ebenfalls antagonisierbar [95].

Wistar-Ratten, bei denen durch die Gabe von Streptozocin ein Diabetes Mellitus induziert wird, zeigen ebenso eine perivaskuläre und interstitielle Kollagenablagerung sowohl im rechten als auch im linken Ventrikel. Streptozocin ist ein Glucosamin mit toxischer Wirkung auf die insulinproduzierenden β -Zellen der pankreatischen Langerhans-Inselzellen. Durch die Verabreichung dieser Substanz wird im Tierversuch ein Insulinmangel-Diabetes erzeugt. Die auftretende kardiale Fibrosierung kann durch Spironolacton-Therapie positiv beeinflusst werden [96].

Bei den Versuchstieren in unserer Studie lag der systolische Blutdruck bei den diabetischen Gruppen von Beginn an etwas niedriger als bei den gesunden Kontrolltieren.

Salzbelastung führte sowohl bei ZDL- als auch bei ZDF-Tieren zu einem Blutdruckanstieg. Dieser war bei ZDF-Tieren stärker ausgeprägt ($p < 0,05$ vs. $p < 0,001$). Durch Eplerenontherapie kam es zu nur bei diabetischen Tieren unter Hochsalzdiät zu einer signifikanten Reduktion des systolischen Blutdrucks. Bezüglich des Ausmaßes der systemischen Blutdrucksenkung bei salzbelasteten ZDF-Tieren zeigte sich erwartungsgemäß kein Unterschied zwischen Eplerenon und Hydralazin.

Die salzabhängige Wirkung von Aldosteronantagonisten auf den Blutdruck untersuchten unter anderem auch Huang et al. an Wistar-Ratten, bei denen durch

Diskussion

Verabreichung von Capsaicin eine sensorische Denervierung mit konsekutivem arteriellen Hypertonus erzeugt wurde. Hier konnte durch Gabe von Spironolacton eine Hypertonieentwicklung bei Tieren, die unter Salzdiät einen signifikanten Blutdruckanstieg aufweisen, verhindert werden [97].

Auch unsere Ergebnisse lassen vermuten, dass die blutdrucksenkende Wirkung von Eplerenon einer Salzabhängigkeit unterliegt. Bei Niedrig- bzw. Normalsalzdiät scheint eine Wirkung auf den systolischen Blutdruck nur in abgeschwächter Form zu erfolgen.

Bei der Echokardiographie der Tiere in der 24. Lebenswoche waren die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen nur gering ausgeprägt: Der LVIDd war bei Tieren unter nutritiver Salzbelastung allenfalls tendenziell etwas höher, sowohl bei gesunden als auch bei diabetischen Ratten. Unter Eplerenontherapie konnte er leicht gesenkt werden. Bei der Messung der Septumdicke zeigten diabetische Tiere unter Hochsalzdiät eine leichte (statistisch nicht signifikante) Septumhypertrophie. Ein positiver Einfluss einer Medikamentengabe konnte hier nicht nachgewiesen werden. Die Verkürzungsfraktion war bei kranken Tieren unter Salzbelastung tendenziell erhöht. Diese Entwicklungen sind vermutlich als kardiale Kompensationsmechanismen unter Volumenbelastung zu verstehen.

Hypothese 4: Die antifibrotische Wirkung ist nicht nur auf die systemische Blutdrucksenkung zurückzuführen, sondern vor allem auf die direkte Rezeptor-Blockade am Myokard. Deshalb wirkt Hydralazin weniger antifibrotisch als Eplerenon.

Der selektive Aldosteron-Antagonist Eplerenon verhindert die Bindung des Mineralkortikoids Aldosteron an seinen Rezeptor und vermag auf diese Weise, den Aldosteron-vermittelten Mechanismen entgegenzuwirken.

Er wirkt einerseits systemisch blutdrucksenkend und kann andererseits auch über direkte Wirkung in den jeweiligen Geweben Aldosteron-induzierte Endorganschädigungen verhindern [66, 98].

Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus (Conn-Syndrom) zeigen im Vergleich mit Patienten mit essentieller Hypertonie ein größeres Ausmaß an kardialen Umbauvorgängen im Sinne einer linksventrikulären Hypertrophie und eines kardiovaskulären Remodelings trotz vergleichbar hoher Blutdruckwerte [99, 100].

Der Prozess der myokardialen Fibrosierung, der durch die Kombination aus nutritiver Kochsalzbelastung und erhöhten systemischen Aldosteronwerten induziert wird, findet sowohl im linken als auch im rechten Ventrikel statt. Bereits kleine Dosierungen des ARBs Spironolacton verminderten die Entstehung der kardialen Fibrosierung, ohne die durch Aldosteron und Salz getriggerte Hypertonie zu beeinflussen. Es scheinen also vor allem Blutdruck-unabhängige Effekte des Aldosterons zu sein, die diese Entwicklung begünstigen [26, 27, 101].

In zwei unabhängigen Studien an SHRSP- und GCA-KO-Ratten konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der Tiere mit dem peripheren Vasodilatator Hydralazin den linksventrikulären Kollagengehalt (als Ausdruck der myokardialen Fibrosierung) weniger effektiv senkt als eine Therapie mit Eplerenon. Dies weist darauf hin, dass nicht die systemische Blutdrucksenkung, sondern die Blockade der spezifischen Aldosteronwirkung im Gewebe einen Benefit brachte [42, 79].

Bei dem vorliegenden Versuch wurde neben den ZDF-Tieren eine zusätzliche Kontrollgruppe von Tieren gebildet, die unter Hochsalzdiät mit Hydralazin behandelt wurden. Damit sollte der Effekt einer systemischen, durch Eplerenon bewirkten Blutdrucksenkung von der direkten gewebsvermittelten Wirkung des Medikaments abgegrenzt werden.

Diskussion

Wie zuvor beschrieben führte eine nutritive Salzbelastung sowohl bei diabetischen als auch bei gesunden Kontroll-Tieren zu einem Anstieg des systolischen Blutdrucks. Die Behandlung der Tiere mit dem spezifischen Angiotensin-Rezeptor-Blocker Eplerenon konnte den Blutdruck nur bei ZDF-Tieren senken. Auf gesunde Tiere hatte Eplerenon keinen blutdrucksenkenden Effekt. Hydralazin senkte den systolischen Blutdruck bei salzbelasteten ZDF-Ratten in ähnlichem Ausmaß wie Eplerenon.

Echokardiographisch konnte beobachtet werden, dass vor allem eine Kombination aus erhöhtem Aldosteronspiegel und nutritiver Salzbelastung bei ZDF-Tieren eine kardiale Hypertrophie auslöst. Unter Eplerenongabe kam es nur bei diabetischen Tieren unter Hochsalzdiät zu einer teilweisen Reduktion der Hypertrophie. Bei Tieren unter Normalsalzdiät hatte Eplerenon keine Wirkung. Ein ähnliches Bild zeigte sich auch hinsichtlich des linksventrikulären Fibrosegrades.

Im Gegensatz zu den oben genannten Studien von Endemann et al. [42] und Zhang et al. [79] konnten in vorliegender Studie die Überlegenheit einer Eplerenontherapie gegenüber einer Behandlung mit Hydralazin in den echokardiographischen sowie histologischen Untersuchungen nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Hypothese 5: Diabetische Tiere sind physisch weniger belastbar. Die Belastbarkeit ist besser bei mit Eplerenon behandelten Tieren, da diese eine weniger stark ausgeprägte linksventrikuläre Hypertrophie aufweisen. Analog zu 4. ist eine Therapie mit Hydralazin weniger effektiv.

Das metabolische Syndrom mit Adipositas und reduzierter kardiorespiratorischer Funktion schränkt sowohl die körperliche Belastbarkeit als auch die Lebensqualität betroffener Patienten ein [102-104]. Auch in Versuchen mit diabetischen Ratten zeigte sich, dass die maximale physische Leistungsfähigkeit mit fortschreitender Erkrankung abnimmt [105, 106].

In der vorliegenden Studie untersuchten wir die Hypothese, dass die Therapie mit Eplerenon nicht nur das ventrikuläre Remodelling verhindern, sondern sich auch direkt auf die körperliche Fitness positiv auswirken würde.

Wie erwartet war die Ausdauer der diabetischen Tiere auf dem Laufband im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren erheblich reduziert. Während die gesunden Ratten unabhängig von einer salzreichen Diät durchschnittliche Laufstrecken von rund 370m zurücklegten, erreichten die diabetischen Tiere Laufstrecken zwischen 180 und 220m. Die Unterschiede zwischen den diabetischen Untergruppen waren nicht signifikant. Insbesondere konnte weder bei Hydralazin- noch bei Eplerenontherapie eine Leistungssteigerung verzeichnet werden. Obgleich wie oben beschrieben eine tendenzielle Verringerung des Herzgewichtes sowie des linksventrikulären Fibrosegrades bei den Eplerenon-behandelten Tieren beobachtet werden konnte, stieg die maximale körperliche Belastbarkeit der Tiere nicht an. Möglicherweise spielen auch der Zeitpunkt des Therapiebeginns, die Therapiedauer und der Zeitpunkt der Untersuchung eine Rolle.

In tierexperimentellen Studien anderer Arbeitsgruppen zeigte sich, dass sich wiederholtes körperliches Training positiv auf die kardiorespiratorische Situation diabetischer Ratten auswirken kann [106]. Unter Umständen könnte eine Kombination aus wiederholtem Training und Aldosteronblockade bei Tieren mit metabolischem Syndrom zu einer messbaren Verbesserung führen.

Diskussion

In einer klinischen Pilotstudie zur derzeit laufenden TOPCAT-Studie zeigten Daniel et al. an 11 Patientinnen mit diastolischer Herzinsuffizienz eine signifikante Verbesserung der physischen Leistungsfähigkeit nach einer viermonatigen Behandlung mit Spironolacton [107]. In der multizentrischen, randomisierten, doppelblinden, placebokontrollierten TOPCAT-Studie des National Institute of Health (UK) werden derzeit die Auswirkungen einer Spironolacton-Therapie auf die Lebensqualität von 3515 herzinsuffizienten Patienten untersucht [108].

Eine weitere derzeit durchgeführte klinische Studie (ALDO-DHF) der Universität Göttingen beschäftigt sich ebenfalls mit dieser Fragestellung. Hier wird an 420 Patienten mit diastolischer Herzinsuffizienz der Einfluss einer Aldosteron-Rezeptorblockade mit Spironolacton auf die körperliche Leistungsfähigkeit untersucht [109].

Hypothese 6: Die linksventrikuläre Konzentration der natriuretischen Peptide ANP und BNP steigt mit zunehmendem Blutdruck und linksventrikulärer Hypertrophie. Sie können deshalb als Maß für die kardiale Schädigung bei Tieren mit metabolischem Syndrom verwendet werden.

Bei Patienten mit fortgeschrittener ventrikulärer Hypertrophie oder Herzinsuffizienz (NYHA III) sind die Plasmaspiegel der natriuretischen Peptide erhöht [43, 45].

Beim metabolischen Syndrom hingegen können ANP- und BNP-Spiegel, wie neuere Studien zeigen, sogar erniedrigt sein. Insbesondere bei adipösen Patienten mit hohem BMI scheint dieser inverse Zusammenhang besonders ausgeprägt zu sein [110, 111]. Es wird vermutet, dass bei adipösen Patienten die Ausschüttung natriuretischer Peptide beeinträchtigt ist. So zeigten experimentelle Studien einen inadäquaten Anstieg der Serum-ANP-Konzentration übergewichtiger Patienten nach intravenöser Volumenzufuhr (*natriuretic handicap*) [112]. Erhöhte Triglyceride, erniedrigtes HDL und erhöhte Nüchtern-Blutzuckerwerte scheinen ebenfalls mit erniedrigten Serum-ANP-Konzentrationen einherzugehen. Hohe systolische Blutdrücke über längere Zeiträume bedingen dagegen eher eine Erhöhung der ANP-Spiegel [110]. Tierexperimentelle Studien an Modellen des metabolischen Syndromes liegen bisher nur in geringer Anzahl vor. Fredersdorf et al. und auch Huang et al. wiesen bei ZDF-Ratten auf mRNA-Ebene eine erhöhte ANP-Expression nach [113, 114].

Die Serum-Konzentrationen der natriuretischen Peptide bilden die kardialen Umbauvorgänge beim metabolischen Syndrom nach derzeitigem Kenntnisstand nur uneinheitlich ab. Insbesondere eine Erhöhung des BNP-Spiegels könnte jedoch (auch aufgrund seiner ventrikulären Exprimierung) ein wertvoller laborchemischer Parameter für eine bevorstehende kardiale Dekompensation im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung sein [45, 115].

Diskussion

In unserer Studie wurden sowohl die linksventrikulären ANP- und BNP-Konzentrationen als auch die mRNA-Expression beider Peptide untersucht.

Bei den Untersuchungen zur Genexpression fiel auf mRNA-Ebene eine tendenziell erhöhte linksventrikuläre ANP-Expression der kranken Tiere im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren auf. Bei den mit Eplerenon und Hydralazin behandelten Gruppen zeigte sich kein wesentlicher Unterschied zu den unbehandelten ZDF-Gruppen.

Die Messung der ANP-Proteinkonzentration zeigte in unserer Studie bei diabetischen Tieren statistisch signifikant erhöhte Werte (t-Test). Diese wurden weder durch Salzbelastung, noch durch eine medikamentöse Therapie mit Eplerenon oder Hydralazin wesentlich beeinflusst.

Ähnliche Ergebnisse ergaben sich bei der Untersuchung der linksventrikulären BNP-Genexpression und der BNP-Proteinspiegel. Die Tiere mit metabolischem Syndrom (ZDF-Ratten) zeigten wiederum erhöhte Werte im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren (keine statistische Signifikanz). Diese Veränderungen wurden weder durch Salzbelastung noch durch die Behandlung der Tiere mit Eplerenon oder Hydralazin wesentlich beeinflusst.

Wir stellten also fest, dass sowohl die Genexpression als auch die Proteinkonzentrationen beider natriuretischer Peptide bei Tieren mit metabolischem Syndrom im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren durchaus verändert sind.

Die ANP-Spiegel waren dabei in unserer Studie, anders als in den klinischen Studien von Wang et al. und Olsen et al., erhöht. Bezüglich der ANP-Genexpression im linken Ventrikel waren unsere Ergebnisse konkordant mit den Untersuchungen von Fredersdorf et al. und Huang et al. [113, 115].

Die Ausprägung der Veränderungen dieser Parameter hängt möglicherweise auch vom vorliegenden Erkrankungsstadium ab.

In vorliegender Studie war, wie bereits beschrieben, kein signifikanter Effekt einer Eplerenontherapie auf die Sekretion natriuretischer Peptide nachzuweisen. Ursächlich hierfür könnte zum einen die begrenzte Anzahl der in den einzelnen Gruppen zur Verfügung stehenden Tiere sein. Zum anderen könnten auch die Therapiedauer und -dosis sowie der Grad der kardialen Vorschädigung eine Rolle spielen.

5 Zusammenfassung

Im Verlauf eines metabolischen Syndroms im ZDF Rattenmodell entwickelt sich ein hyporeninämischer Hyperaldosteronismus. Das erhöhte Serum-Aldosteron führt unter anderem zu kardialer Fibrosierung. Die kardialen Veränderungen werden dabei durch nutritive Salzbelastung noch verstärkt. Dieser Effekt ist auch für ZDF-Ratten, einem etablierten Tiermodell des metabolischen Syndroms, belegt.

In unserer Studie an ZDF-Ratten kam es unter Hochsalzdiät zu einem deutlichen Anstieg der Herzgewichte. Bei gesunden Kontrolltieren verzeichneten wir ebenfalls eine Zunahme der Herzgewichte, diese waren aber nicht signifikant.

Bei der histologischen Beurteilung des linken Ventrikels wies das Myokard der diabetischen Tiere tendenziell vermehrte Kollageneinlagerungen sowie leicht hypertrophierte Kardiomyozyten auf. Auch dieser Effekt scheint bei Salzbelastung noch ausgeprägter zu sein.

In unseren Versuchen war bei Aldosteron-Rezeptor-Blockade mit Eplerenon zumindest bei den ZDF-Tieren der Hochsalzgruppe ein positiver Einfluss zu erkennen. Die Herzgewichte und der linksventrikuläre Fibrosegrad waren unter der Therapie messbar reduziert, eine statistische Signifikanz bestand jedoch aufgrund der kleinen Anzahl an Versuchstieren nicht.

Bei Hochsalzbelastung kam es sowohl bei gesunden als auch bei diabetischen Tieren zu einem signifikanten Anstieg des systolischen Blutdruckes. Eplerenon konnte den Blutdruck bei den diabetischen Tieren, bei denen der Blutdruckanstieg noch deutlicher war, signifikant senken. Eine vergleichbare Blutdrucksenkung konnte auch mit Hydralazin erreicht werden.

Die physische Ausdauer der diabetischen Tiere im Laufbandversuch war im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren erheblich reduziert. Einen positiven Einfluss einer Eplerenontherapie konnten wir nicht beobachten. Das höhere Ausgangsgewicht der kranken Tiere könnte dabei ebenso wie der Zeitpunkt des Therapiebeginns, die Therapiedauer und der Zeitpunkt der Untersuchung eine Rolle spielen.

Neben den histologischen Untersuchungen führten wir auch echokardiographische Messungen der diastolischen Septumdicke, des LVISd und

Zusammenfassung

der Verkürzungsfraction durch. Einen wesentlichen Vorteil durch die Behandlung der Tiere mit Eplerenon konnten wir echokardiographisch nicht nachweisen.

Unsere Ergebnisse sprechen für eine wechselseitige Verstärkung der Risikofaktoren Diabetes mellitus, Hyperaldosteronismus und Hochsalzdiät. Bei Vorliegen aller drei Faktoren wirkte sich in unserer Studie eine Therapie mit Eplerenon hinsichtlich des kardialen Remodellings zumindest ansatzweise positiv aus. Eine statistische Signifikanz konnten wir mit unserem Versuchsaufbau jedoch nicht belegen.

Als Erweiterung unserer Arbeit bestimmten wir die linksventrikulären Proteinkonzentrationen sowie die Genexpression der natriuretischen Peptide ANP und BNP. Die diabetischen Tiere wiesen signifikant erhöhte ANP-Spiegel auf. Die BNP-Konzentrationen waren ebenfalls tendenziell erhöht. Die Genexpression beider Peptide im linken Ventrikel war ebenfalls leicht gesteigert. Der diagnostische Wert der natriuretischen Peptide beim metabolischen Syndrom bleibt in weiteren Studien noch zu prüfen.

6 Ausblick

Neuere Forschungsergebnisse zeigen, dass ein Hyperaldosteronismus auch beim Diabetes mellitus, wie er etwa in Folge eines metabolischen Syndromes auftritt, das kardiale Remodelling im wesentlichen Ausmaß mitverursacht. Die systemische (blutdrucksteigernde) sowie insbesondere die direkte rezeptor-vermittelte Wirkung am Myokard führen zur diabetischen Kardiomyopathie. Bei v. a. in den westlichen Industrienationen zunehmender Anzahl an Patienten mit der „Volkskrankheit Diabetes“ bzw. metabolischem Syndrom erlangt dieser Aspekt immer mehr klinische Relevanz.

In der vorliegenden Studie untersuchten wir die protektive Wirkung des Einsatzes von Eplerenon auf die diabetische Kardiomyopathie, bei der die Aldosteronwirkung direkt an den Endorganen blockiert wird. Vor allem bei Kombination der Risikofaktoren Diabetes plus salzreiche Ernährung, wie sie in großer Zahl auch bei den betroffenen Patienten vorliegt, scheint Eplerenon tendenziell einen positiven Einfluss zu nehmen. Aufgrund der kleinen Anzahl an Versuchstieren und der hohen Anzahl der verschiedenen Gruppen konnten statistisch signifikante Zusammenhänge jedoch nicht eindeutig belegt werden. So sollte diese Studie mit größeren Gruppen und evtl. geringerer Anzahl an Subgruppen wiederholt werden. Wenn diese Wiederholung signifikante Ergebnisse erbringt, so sind zukünftig neue Einsatzgebiete der Aldosteronantagonisten in Betracht zu ziehen. Die bisherigen Indikationen wie die Herzinsuffizienz, der abgelaufene Myokardinfarkt und die diabetische Nephropathie, könnten dann ggf. erweitert werden und Aldosteronantagonisten dann auch zur Verhinderung der diabetischen Kardiomyopathie und beim Diabetiker in der Frühphase der arteriellen Hypertonie (oder bereits vor Ausbildung einer manifesten Hypertonie) eingesetzt werden. Hierzu wären für diese Indikationen klinische Studien, die den Aldosteron-Antagonisten mit dem ACE-Hemmer bzw. dem Angiotensin II-Blocker vergleichen, anzustreben.

7 Quellenverzeichnis

1. **Reaven GM**, *Syndrome X*. Blood Press Suppl. 1992;4:13-6.
2. **Hanefeld M, Schaper F, Ceriello A**, *History and definition(s) of metabolic syndrome*. Internist (Berl). 2007 Feb;48(2):117-25.
3. **Burger M, Tiemann F**, *Diabetes mellitus in Germany. Review of the situation according to the 2003 Telephone Health Survey*. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz. 2005 Nov;48(11):1242-9.
4. **Alberti KG, Zimmet P, Shaw J; IDF Epidemiology Task Force Consensus Group**, *The metabolic syndrome -a new worldwide definition*. Lancet. 2005 Sep 24-30;366(9491):1059-62.
5. **Grundy SM, Benjamin IJ, Burke GL, Chait A, Eckel RH, Howard BV, Mitch W, Smith SC Jr, Sowers JR**, *Diabetes and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association*. Circulation. 1999;100(10):1134-46.
6. **Devereux RB, Roman MJ, Paranicas M, O'Grady MJ, Lee ET, Welty TK, Fabsitz RR, Robbins D, Rhoades ER, Howard BV**, *Impact of diabetes on cardiac structure and function: the strong heart study*. Circulation. 2000 May 16;101(19):2271-6.
7. **Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D**, *Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial*. Diabetes Care. 1993 Feb.16(2):434-44.
8. **Kannel WB, Hjortland M, Castelli WP**, *Role of diabetes in congestive heart failure: the Framingham study*. Am J Cardiol. 1974 Jul;34(1):29-34.
9. **Kannel WB, McGee DL**, *Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study*. JAMA. 1979 May 11;241(19):2035-8.
10. **Geiss LS, Herman WH, Smith PJ, National Diabetes Data Group**, *Mortality in Non-Insulin-Dependent Diabetes*. Diabetes in America. Bethesda, Md: National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. 1995;233-257.
11. **Rubler S, Dlugash J, Yuceoglu YZ, Kumral T, Branwood AW, Grishman A**, *New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis*. Am J Cardiol. 1972 Nov 8;30(6):595-602.
12. **Schannwell CM, Schneppenheim M, Perings S, Plehn G, Strauer BE**, *Left ventricular diastolic dysfunction as an early manifestation of diabetic cardiomyopathy*. Cardiology. 2002;98(1-2):33-9.
13. **Fang ZY, Prins JB, Marwick TH**, *Diabetic cardiomyopathy: evidence, mechanisms, and therapeutic implications*. Endocr Rev. 2004 Aug;25(4):543-67.
14. **Di Bonito P, Cuomo S, Moio N, Sibilio G, Sabatini D, Quattrin S, Capaldo B**, *Diastolic dysfunction in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus of short duration*. Diabet Med. 1996 Apr;13(4):321-4.
15. **Nicolino A, Longobardi G, Furgi G, Rossi M, Zoccolillo N, Ferrara N, Rengo F**, *Left ventricular diastolic filling in diabetes mellitus with and without hypertension*. Am J Hypertens. 1995 Apr;8(4 Pt 1):382-9.

Quellenverzeichnis

16. **Poirier P, Bogaty P, Garneau C, Marois L, Dumesnil JG**, *Diastolic dysfunction in normotensive men with well-controlled type 2 diabetes: importance of maneuvers in echocardiographic screening for preclinical diabetic cardiomyopathy*. *Diabetes Care*. 2001 Jan;24(1):5-10.
17. **Fredersdorf S, Endemann DH, Luchner A, Heitzmann D, Ulucan C, Birner C, Schmid P, Stoelcker B, Resch M, Muders F, Riegger GA, Weil J**, *Increased aldosterone levels in a model of type 2 diabetes mellitus*. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2009 Jan;117(1):15-20.
18. **Umpierrez GE, Cantey P, Smiley D, Palacio A, Temponi D, Luster K, Chapman A**, *Primary aldosteronism in diabetic subjects with resistant hypertension*. *Diabetes Care*. 2007 Jul;30(7):1699-703.
19. **Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R**, *Physiology of local renin-angiotensin systems*. *Physiol Rev*. 2006 Jul;86(3):747-803.
20. **Wehling M**, *Effects of aldosterone and mineralocorticoid receptor blockade on intracellular electrolytes*. *Heart Fail Rev*. 2005 Jan;10(1):39-46.
21. **Silbernagl S, Despopoulos A**, *Taschenatlas der Physiologie*, ed. Thieme. Vol. 6. 2003, Stuttgart. 436.
22. **Mihailidou AS, Buhagiar KA, Rasmussen HH**, *Na⁺ influx and Na⁽⁺⁾-K⁺ pump activation during short-term exposure of cardiac myocytes to aldosterone*. *Am J Physiol*. 1998 Jan;274(1 Pt 1):C175-81.
23. **Weber KT**, *Aldosterone in congestive heart failure*. *N Engl J Med*. 2001 Dez;345(23):1689-97.
24. **Rocha R, Rudolph AE, Friedrich GE, Nachowiak DA, Kekec BK, Blomme EA, McMahon EG, Delyani JA**, *Aldosterone induces a vascular inflammatory phenotype in the rat heart*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002 Nov;283(5):H1802-10.
25. **Callera GE, Touyz RM, Tostes RC, Yogi A, He Y, Malkinson S, Schiffrin EL**, *Aldosterone activates vascular p38MAP kinase and NADPH oxidase via c-Src*. *Hypertension*. 2005 Apr;45(4):773-9.
26. **Brilla CG, Weber KT**, *Reactive and reparative myocardial fibrosis in arterial hypertension in the rat*. *Cardiovasc Res*. 1992 Jul;26(7):671-7.
27. **Brilla CG, Weber KT**, *Mineralocorticoid excess, dietary sodium, and myocardial fibrosis*. *J Lab Clin Med*. 1992 Dez;120(6):893-901.
28. **Young M, Fullerton M, Dilley R, Funder J**, *Mineralocorticoids, hypertension, and cardiac fibrosis*. *J Clin Invest*. 1994 Jun;93(6):2578-83.
29. **Sun Y, Ramires FJ, Weber KT**, *Fibrosis of atria and great vessels in response to angiotensin II or aldosterone infusion*. *Cardiovasc Res*. 1997 Jul;35(1):138-47.
30. **Dzau VJ**, *Short- and long-term determinants of cardiovascular function and therapy: contributions of circulating and tissue renin-angiotensin systems*. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1989;14 Suppl 4:S1-5.
31. **Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J**, *The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators*. *N Engl J Med*. 1999 Sep 2;341(10):709-17.

Quellenverzeichnis

32. **Rossier BC**, *Mechanisms of action of mineralocorticoid hormones*. *Endocr Res*. 1989;15(1-2):203-26.
33. **Duarte J, Martinez A, Bermejo A, Vera B, Gámez MJ, Cabo P, Zarzuelo A**, *Cardiovascular effects of captopril and enalapril in obese Zucker rats*. *Eur J Pharmacol*, 1999 Jan 22;365(2-3):225-32.
34. **Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G**, *Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators*. *N Engl J Med*, 2000 Jan 20;342(3):145-53.
35. **Dahlöf B, Devereux RB, Kjeldsen SE, Julius S, Beevers G, de Faire U, Fyhrquist F, Ibsen H, Kristiansson K, Lederballe-Pedersen O, Lindholm LH, Nieminen MS, Omvik P, Oparil S, Wedel H; LIFE Study Group**, *Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol*. *Lancet*. 2002 Mar 23;359(9311):995-1003.
36. **Lindholm LH, Ibsen H, Dahlöf B, Devereux RB, Beevers G, de Faire U, Fyhrquist F, Julius S, Kjeldsen SE, Kristiansson K, Lederballe-Pedersen O, Nieminen MS, Omvik P, Oparil S, Wedel H, Aurup P, Edelman J, Snapinn S; LIFE Study Group**, *Cardiovascular morbidity and mortality in patients with diabetes in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol*. *Lancet*. 2002 Mar 23;359(9311):1004-10.
37. **Struthers AD**, *Aldosterone escape during angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy in chronic heart failure*. *J Card Fail*. 1996 Mar;2(1):47-54.
38. **Staessen J, Lijnen P, Fagard R, Verschueren LJ, Amery A**, *Rise in plasma concentration of aldosterone during long-term angiotensin II suppression*. *J Endocrinol*. 1981;91(3):457-65.
39. **Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, Bittman R, Hurley S, Kleiman J, Gatlin M, Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study Investigators**, *Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction*. *N Engl J Med*. 2003 Apr 3;348(14):1309-21.
40. **Pitt B, Reichek N, Willenbrock R, Zannad F, Phillips RA, Roniker B, Kleiman J, Krause S, Burns D, Williams GH**, *Effects of eplerenone, enalapril, and eplerenone/enalapril in patients with essential hypertension and left ventricular hypertrophy: the 4E-left ventricular hypertrophy study*. *Circulation*. 2003 Oct 14;108(15):1831-8.
41. **Martinez DV, Rocha R, Matsumura M, Oestreicher E, Ochoa-Maya M, Roubanthisuk W, Williams GH, Adler GK**, *Cardiac damage prevention by eplerenone: comparison with low sodium diet or potassium loading*. *Hypertension*. 2002 Feb;39(2 Pt 2):614-8.
42. **Endemann DH, Touyz RM, Iglarz M, Savoia C, Schiffrin EL**, *Eplerenone prevents salt-induced vascular remodeling and cardiac fibrosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats*. *Hypertension*. 2004 Jun;43(6):1252-7.
43. **Levin ER, Gardner DG, Samson WK**, *Natriuretic Peptides*. *N Engl J Med*. 1998 Jul 30;339(5):321-8.

Quellenverzeichnis

44. **Rubattu S, Sciarretta S, Valenti V, Stanzione R, Volpe M**, *Natriuretic peptides: an update on bioactivity, potential therapeutic use, and implication in cardiovascular diseases*. *Am J Hypertens*. 2008 Jul;21(7):733-41. Epub 2008 May 8.
45. **Langenickel T, Pagel I, Höhnel K, Dietz R, Willenbrock R**, *Differential regulation of cardiac ANP and BNP mRNA in different stages of experimental heart failure*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000 May;278(5):H1500-6.
46. **Zucker TF, Zucker LM**, *Hereditary obesity in the rat associated with high serum fat and cholesterol*. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1962;110:165-71.
47. **Iida M, Murakami T, Ishida K, Mizuno A, Kuwajima M, Shima K**, *Substitution at codon 269 (glutamine --> proline) of the leptin receptor (OB-R) cDNA is the only mutation found in the Zucker fatty (fa/fa) rat*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996 Jul 16;224(2):597-604.
48. **Zucker TF, Zucker LM**, *Fat accretion and growth in the rat*. *J Nutr*. 1963; 80:6-19.
49. **Zucker LM, Antoniadis HN**, *Insulin and obesity in the Zucker genetically obese rag "fatty"*. *Endocrinology*. 1972;90(5):1320-30.
50. **Peterson RG, Shaw WN, Neel MA, Little LA, Eichberg J, Zucker** *Diabetic Fatty Rat as a Model for Non-insulin-dependent Diabetes Mellitus*. *ILAR News*. 1990;32(3):16-9.
51. **Clark JB, Palmer,CJ, Shaw WN**, *The diabetic Zucker fatty rat*. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1983 May;173(1):68-75.
52. **Sparks JD, Phung TL, Bolognino M, Cianci J, Khurana R, Peterson RG, Sowden MP, Corsetti JP, Sparks CE**, *Lipoprotein alterations in 10- and 20-week-old Zucker diabetic fatty rats: hyperinsulinemic versus insulinopenic hyperglycemia*. *Metabolism*. 1998 Nov;47(11):1315-24.
53. **Iyengar SK, Stein CM, Russo K, Erokwu BO, Strohl KP**, *The fa leptin receptor mutation and the heritability of respiratory frequency in a Brown Norway and Zucker intercross*. *J Appl Physiol*. 2004 Sep;97(3):811-20.
54. **Plumb DC**, *Veterinary Drug Handbook*. PharmaVet Publishing, White Bear Lake (USA). 1999. 853.
55. **Mullis KB, Faloona FA**, *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*. *Methods Enzymol*. 1987;155:335-50.
56. **Lee LG, Connell CR, Bloch W**, *Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes*. *Nucleic Acids Res*. 1993 Aug 11;21(16):3761-6.
57. **Wenzel W, Ammann MJ**, *Lexikon der Gentechnologie*. 1991.
58. **Pierce J, Suelter CH**, *An evaluation of the Coomassie brilliant blue G-250 dye-binding method for quantitative protein determination*. *Anal Biochem*. 1977 Aug;81(2):478-80.
59. **Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC**, *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. *Anal Biochem*. 1985 Oct;150(1):76-85.
60. **Berson SA, Yalow RS**, *General principles of radioimmunoassay*. *Clin Chim Acta*. 2006 Jul 31;369(2):125-43.

Quellenverzeichnis

61. **Blasi ER, Rocha R, Rudolph AE, Blomme EA, Polly ML, McMahon EG**, *Aldosterone/salt induces renal inflammation and fibrosis in hypertensive rats*. *Kidney Int.* 2003 May;63(5):1791-800.
62. **Park JB, Schiffrin EL**, *Cardiac and vascular fibrosis and hypertrophy in aldosterone-infused rats: role of endothelin-1*. *Am J Hypertens.* 2002 Feb;15(2 Pt 1): p. 164-9.
63. **Duprez D, De Buyzere M, Rietzschel ER, Clement DL**, *Aldosterone and vascular damage*. *Curr Hypertens Rep.* 2000 Jun;2(3):327-34.
64. **Rocha R, Chander PN, Khanna K, Zuckerman A, Stier CT Jr**, *Mineralocorticoid blockade reduces vascular injury in stroke-prone hypertensive rats*. *Hypertension.* 1998 Jan;31(1 Pt 2): p. 451-8.
65. **Rocha R, Chander PN, Zuckerman A, Stier CT Jr**, *Role of aldosterone in renal vascular injury in stroke-prone hypertensive rats*. *Hypertension.* 1999 Jan;33(1 Pt 2):232-7.
66. **De Mello WC**, *Renin Angiotensin System and the Heart*. *Trophic Effects of Aldosterone*, ed. C. Delcayre, et al. 2004, London: John Wiley and Sons. 244.
67. **Susic D, Varagic J, Frohlich ED**, *Cardiovascular effects of inhibition of renin-angiotensin-aldosterone system components in hypertensive rats given salt excess*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010 Apr;298(4):H1177-81. Epub 2010 Jan 29.
68. **Okoshi MP, Yan X, Okoshi K, Nakayama M, Schuldt AJ, O'Connell TD, Simpson PC, Lorell BH**, *Aldosterone directly stimulates cardiac myocyte hypertrophy*. *J Card Fail.* 2004 Dec;10(6):511-8.
69. **The Consensus Trial Study Group**, *Effects of Enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS)*. *N Engl J Med.* 1987 Jun 4;316(23):1429-35.
70. **The Solvd Investigators**, *Effect of enalapril on mortality and the development of heart failure in asymptomatic patients with reduced left ventricular ejection fractions*. *N Engl J Med.* 1992 Sep 3;327 (10):685-691.
71. **Jeunemaitre X, Chatellier G, Kreft-Jais C, Charru A, DeVries C, Plouin PF, Corvol P, Menard J**, *Efficacy and tolerance of spironolactone in essential hypertension*. *Am J Cardiol.* 1987 Oct 1;60:820-5.
72. **Delyani JA, Robinson EL, Rudolph AE**, *Effect of a selective aldosterone receptor antagonist in myocardial infarction*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001 Aug;281(2):H647-54.
73. **Fraccarollo D, Galuppo P, Hildemann S, Christ M, Ertl G, Bauersachs J**, *Additive improvement of left ventricular remodeling and neurohormonal activation by aldosterone receptor blockade with eplerenone and ACE inhibition in rats with myocardial infarction*. *J Am Coll Cardiol.* 2003 Nov 5;42(9):1666-73.
74. **Susic D, Varagic J, Ahn J, Matavelli L, Frohlich ED**, *Long-term mineralocorticoid receptor blockade reduces fibrosis and improves cardiac performance and coronary hemodynamics in elderly SHR*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007 Jan.292(1):H175-9.
75. **Suzuki G, Morita H, Mishima T, Sharov VG, Todor A, Tanhehco EJ, Rudolph AE, McMahon EG, Goldstein S, Sabbah HN**, *Effects of long-term monotherapy with eplerenone,*

Quellenverzeichnis

- a novel aldosterone blocker, on progression of left ventricular dysfunction and remodeling in dogs with heart failure.* Circulation. 2002 Dec 3;106(23):2967-72.
76. **Kobayashi N, Yoshida K, Nakano S, Ohno T, Honda T, Tsubokou Y, Matsuoka H,** *Cardioprotective mechanisms of eplerenone on cardiac performance and remodeling in failing rat hearts.* Hypertension. 2006 Apr;47(4):671-9. Epub 2006 Feb 27.
77. **Wahed MI, Watanabe K, Ma M, Yamaguchi K, Takahashi T, Tachikawa H, Kodama M, Aizawa Y,** *Effects of eplerenone, a selective aldosterone blocker, on the progression of left ventricular dysfunction and remodeling in rats with dilated cardiomyopathy.* Pharmacology. 2005 Feb;73(2):81-8.
78. **Urabe A, Izumi T, Abe Y, Taniguchi I, Mochizuki S,** *Effects of eplerenone and salt intake on left ventricular remodeling after myocardial infarction in rats.* Hypertens Res. 2006 Aug;29(8):627-34.
79. **Zhang Q, Saito Y, Naya N, Imagawa K, Somekawa S, Kawata H, Yakeda Y, Uemura S, Kishimoto I, Nakao K,** *The specific mineralocorticoid receptor blocker eplerenone attenuates left ventricular remodeling in mice lacking the gene encoding guanylyl cyclase-A.* Hypertens Res. 2008;31(6):1251-6.
80. **Nishioka T, Suzuki M, Onishi K, Takakura N, Inada H, Yoshida T, Hiroe M, Imanaka-Yoshida K,** *Eplerenone attenuates myocardial fibrosis in the angiotensin II-induced hypertensive mouse: involvement of tenascin-C induced by aldosterone-mediated inflammation.* J Cardiovasc Pharmacol. 2007 May;49(5):261-8.
81. **De Mello WC,** *Beneficial effect of eplerenone on cardiac remodeling and electrical properties of the failing heart.* J Renin Angiotensin Aldosterone Syst. 2006;7(1):40-6.
82. **Kurtz TW, Al-Bander HA, Morris RC Jr,** *"Salt-sensitive" essential hypertension in men. Is the sodium ion alone important?* N Engl J Med. 1987 Oct 22;317(17):1043-8.
83. **Simpson FO,** *Salt and hypertension: current data, attitudes, and policies.* J Cardiovasc Pharmacol. 1984;6 Suppl 1:S4-9. **Koga Y, Hirooka Y, Araki S, Nozoe M, Kishi T, Sunagawa K,** *High salt intake enhances blood pressure increase during development of hypertension via oxidative stress in rostral ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats.* Hypertens Res. 2008;31(11):2075-83.
84. **Koga Y, Hirooka Y, Araki S, Nozoe M, Kishi T, Sunagawa K,** *High salt intake enhances blood pressure increase during development of hypertension via oxidative stress in rostral ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats.* Hypertens Res. 2008;31(11):2075-83.
85. **Whelton PK, He J, Appel LJ, Cutler JA, Havas S, Kotchen TA, Roccella EJ, Stout R, Vallbona C, Winston MC, Karimbakas J; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee,** *Primary prevention of hypertension: clinical and public health advisory from The National High Blood Pressure Education Program.* JAMA. 2002 Oct 16;288(15):1882-8.
86. **Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT Jr, Roccella EJ; National Heart, Lung, and Blood Institute Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment**

Quellenverzeichnis

- of High Blood Pressure; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee, *The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report*. JAMA. 2003 May 21;289(19):2560-72.
87. **Chen J, Gu D, Huang J, Rao DC, Jaquish CE, Hixson JE, Chen CS, Chen J, Lu F, Hu D, Rice T, Kelly TN, Hamm LL, Whelton PK, He J; GenSalt Collaborative Research Group**, *Metabolic syndrome and salt sensitivity of blood pressure in non-diabetic people in China: a dietary intervention study*. Lancet. 2009 Mar 7;373(9666):829-35.
88. **Reddy SR, Kotchen TA**, *Dietary sodium chloride increases blood pressure in obese Zucker rats*. Hypertension. 1992 Sep;20(3):389-93.
89. **Pawloski CM, Kanagy NL, Mortensen LH, Fink GD**, *Obese Zucker rats are normotensive on normal and increased sodium intake*. Hypertension. 1992 Jan;19(1 Suppl):I90-5.
90. **Kim JH, Snider T, Abel M, Zemel MB**, *Hypertension in young, healthy Zucker obese rats is not responsive to reduced salt intake*. J Nutr. 1994 May;124(5):713-6.
91. **Hypertension in Diabetes Study (HDS)**: *Prevalence of hypertension in newly presenting type 2 diabetic patients and the association with risk factors for cardiovascular and diabetic complications*. J Hypertens. 1993 Mar;11(3):309-17.
92. **Harris MI, Cowie CC, Stern MP, Boyko EJ, Reiber GE, Bennett PH, eds**, *Diabetes in America*. 2nd ed. Washington, DC: National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 1995.
93. **UK Prospective Diabetes Study Group**, *Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38*. BMJ. 1998 Sep 12;317(7160):703-13.
94. **Fields NG, Yuan BX, Leenen FH**, *Sodium-induced cardiac hypertrophy. Cardiac sympathetic activity versus volume load*. Circ Res. 1991 Mar. 68(3):745-55.
95. **Sun Y, Zhang J, Lu L, Chen SS, Quinn MT, Weber KT**, *Aldosterone-induced inflammation in the rat heart : role of oxidative stress*. Am J Pathol. 2002 Nov;161(5):1773-81.
96. **Miric G, Dallemagne C, Endre Z, Margolin S, Taylor SM, Brown L**, *Reversal of cardiac and renal fibrosis by pirfenidone and spironolactone in streptozotocin-diabetic rats*. Br J Pharmacol. 2001 July; 133(5): 687-94.
97. **Huang Y, Wang DH**, *Role of renin-angiotensin-aldosterone system in salt-sensitive hypertension induced by sensory denervation*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2001 Nov;281(5):H2143-9.
98. **Delyani JA, Rocha R, Cook CS, Tobert DS, Levin S, Roniker B, Workman DL, Sing YL, Whelihan B**, *Eplerenone: a selective aldosterone receptor antagonist (SARA)*. Cardiovasc Drug Rev. 2001 Fall;19(3):185-200.
99. **Rossi GP, Sacchetto A, Visentin P, Canali C, Graniero GR, Palatini P, Pessina AC**, *Changes in Left Ventricular Anatomy and Function in Hypertension and Primary Aldosteronism*. Hypertension. 1996 May;27(5):1039-45.

Quellenverzeichnis

100. **Rossi GP, Sacchetto A, Pavan E, Palatini P, Graniero GR, Canali C, Pessina AC**, *Remodeling of the Left Ventricle in Primary Aldosteronism Due to Conn's Adenoma*. *Circulation*. 1997 Mar 18;95(6):1471-8.
101. **Brilla CG, Matsubara LS, Weber KT**. *Anti-aldosterone treatment and the prevention of myocardial fibrosis in primary and secondary hyperaldosteronism*. *J Mol Cell Cardiol*. 1993 May;25(5):563-75.
102. **Maxwell MS, Goslin BR, Gellish RL, Hightower KR, Olson RE, Moudgil VK, Russi GD**, *Metabolic syndrome status changes with fitness level change: a retrospective analysis*. *Metab Syndr Relat Disord*. 2008 Spring;6(1):8-14.
103. **Hassinen M, Lakka TA, Savonen K, Litmanen H, Kiviahho L, Laaksonen DE, Komulainen P, Rauramaa R**, *Cardiorespiratory fitness as a feature of metabolic syndrome in older men and women: the Dose-Responses to Exercise Training study (DR's EXTRA)*. *Diabetes Care*. 2008 Jun;31(6):1242-7.
104. **Bennett WL, Ouyang P, Wu AW, Barone BB, Stewart KJ**, *Fatness and fitness: how do they influence health-related quality of life in type 2 diabetes mellitus?* *Health Qual Life Outcomes*. 2008 Dec 4;6:110.
105. **Rodrigues B, Figueroa MD, Mostarda CT, Heeren MV, Irigoyen MC, De Angelis K**, *Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats*. *Cardiovasc Diabetol*. 2007;6:38.
106. **Harthmann AD, De Angelis K, Costa LP, Senador D, Schaan BD, Krieger EM, Irigoyen MC**, *Exercise training improves arterial baro- and chemoreflex in control and diabetic rats*. *Auton Neurosci*. 2007 May 30;133(2):115-20.
107. **Daniel KR, Wells G, Stewart K, Moore B, Kitzman DW**, *Effect of aldosterone antagonism on exercise tolerance, Doppler diastolic function, and quality of life in older women with diastolic heart failure*. *Congest Heart Fail*. 2009 Mar-Apr;15(2):68-74.
108. **www.topcatstudy.com**, The trial is sponsored by the National Heart, Lung, and Blood Institute of the National Institutes of Health. New England Research Institutes (NERI) and Brigham & Women's Hospital (BWH) serve as the Clinical Trial Coordinating Center (CTCC) for this study.
109. **Edelmann F, Schmidt AG, Gelbrich G, Binder L, Herrmann-Lingen C, Halle M, Hasenfuss G, Wachter R, Pieske B**, *Rationale and design of the 'aldosterone receptor blockade in diastolic heart failure' trial: a double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel group study to determine the effects of spironolactone on exercise capacity and diastolic function in patients with symptomatic diastolic heart failure (Aldo-DHF)*. *Eur J Heart Fail*. 2010 Aug;12(8):874-82. Epub 2010 Jun 10.
110. **Wang TJ, Larson MG, Keyes MJ, Levy D, Benjamin EJ, Vasan RS**, *Association of plasma natriuretic peptide levels with metabolic risk factors in ambulatory individuals*. *Circulation*. 2007 Mar 20;115(11):1345-53. Epub 2007 Mar 5.
111. **Olsen MH, Hansen TW, Christensen MK, Gustafsson F, Rasmussen S, Wachtell K, Borch-Johnsen K, Ibsen H, Jørgensen T, Hildebrandt P**, *N-terminal pro brain natriuretic*

Quellenverzeichnis

- peptide is inversely related to metabolic cardiovascular risk factors and the metabolic syndrome.* Hypertension. 2005 Oct;46(4):660-6.
112. **Licata G, Volpe M, Scaglione R, Rubattu S**, *Salt-regulating hormones in young normotensive obese subjects. Effects of saline load.* Hypertension. 1994 Jan;23(1 Suppl):I20-4.
113. **Fredersdorf S, Thumann C, Ulucan C, Griese DP, Luchner A, Riegger GA, Kromer EP, Weil J**, *Myocardial hypertrophy and enhanced left ventricular contractility in Zucker diabetic fatty rats.* Cardiovasc Pathol. 2004 Jan-Feb;13(1):11-9.
114. **Huang TH, He L, Qin Q, Yang Q, Peng G, Harada M, Qi Y, Yamahara J, Roufogalis BD, Li Y**, *Salacia oblonga root decreases cardiac hypertrophy in Zucker diabetic fatty rats: inhibition of cardiac expression of angiotensin II type 1 receptor.* Diabetes Obes Metab. 2008 Jul;10(7):574-85. Epub 2007 Jul 21.
115. **Olsen MH, Wachtell K, Tuxen C, Fossum E, Bang LE, Hall C, Ibsen H, Rokkedal J, Devereux RB, Hildebrandt P**, *N-terminal pro-brain natriuretic peptide predicts cardiovascular events in patients with hypertension and left ventricular hypertrophy: a LIFE study.* J Hypertens. 2004 Aug;22(8):1597-604.

8 Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Resch M, Bergler T, Fredersdorf S, Griese DP, Weil J, Kreuzer P, Brunner S, Riegger GA, Luchner A, Endemann DH, *Hyperaldosteronism and altered expression of an SGK1-dependent sodium transporter in ZDF rats leads to salt dependence of blood pressure.* Hypertens Res. 2010 Oct;33(10):1082-8. Epub 2010 Jul 22.

Resch M, Schmid P, Amann K, Fredersdorf S, Weil J, Schach C, Birner C, Griese DP, Kreuzer P, Brunner S, Luchner A, Riegger GA, Endemann DH, *Eplerenone prevents salt-induced vascular stiffness in Zucker diabetic fatty rats: a preliminary report.* Cardiovasc Diabetol. 2011 Oct 18;10:94.

9 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau Dr. med. Sabine Fredersdorf und Herrn PD Dr. med. Dierk Endemann für die Überlassung des Themas sowie für die kompetente Betreuung in allen Stadien dieser Arbeit bedanken.

Weiterhin danke ich Frau Gabriela Pietrzyk, Frau Tatjana Libeld und Frau Daniela Farkas für die Einarbeitung in die Labormethoden, für zahlreiche Verbesserungsvorschläge sowie für die gute Zusammenarbeit.

Für das Korrekturlesen danke ich Herrn Daniel Breiffeld.

Mein besonderer Dank jedoch gilt meinen Eltern, die mich während des Studiums finanziell unterstützten und mich stets motivierten.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten:

NAME: Sabine Andrea Brunner
ADRESSE: Stadtplatz 38
84489 Burghausen
TELEFON: 0151-52453295
EMAIL: sbrunner@gmx.de
GEBURTSDATUM/-ORT: 30.03.1981, Regensburg
FAMILIENSTAND: ledig

Hochschulausbildung:

2002 – 2008 Studium der Humanmedizin, Universität
Regensburg
2004 Physikum
2008 2. Teil der ärztlichen Prüfung (Abschlussnote 2,0)
seit 2005 Promotion in Experimenteller Kardiologie,
Universität Regensburg

Berufliche Tätigkeit

seit 12/2008 Assistenzärztin in der Pädiatrie, Kreiskliniken
Altötting/Burghausen