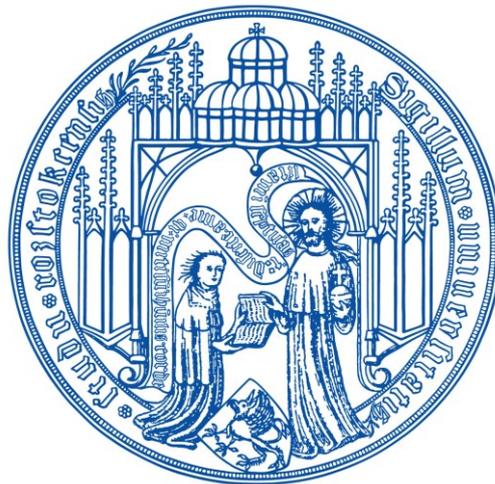


Aus dem Oscar-Langendorff-Institut für Physiologie der Universität Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. R. Köhling

Über die Wirkung von Aliskiren an isolierten Gefäßen und am
isolierten Herzen



Inauguraldissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

„Doktor der Medizin“

der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von

Caroline Tscherpel
aus Rostock

Einreichung Juni 2018, Verteidigung Februar 2019

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00002469

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Noack; Oscar Langendorff Institut für Physiologie, Universitätsmedizin Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. Gustav Steinhoff, Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie, Universitätsmedizin Rostock
3. Gutachter: Prof. Dr. Klaus Kisters, Klinik für Innere Medizin, St. Anna Hospital Herne

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG, STAND DER WISSENSCHAFT UND FRAGESTELLUNG	7
1.1. DAS RENIN-ANGIOTENSIN-ALDOSTERON-SYSTEM UND SEINE PHARMAKOLOGISCHEN ZIELSTRUKTUREN	10
1.1.1. DIE RENIN-ANGIOTENSIN-ALDOSTERON-SIGNALKASKADE	10
1.1.1.1. Renin, Prorenin und der (Pro)renin-Rezeptor	10
1.1.1.2. Von Angiotensinogen über Angiotensin I zu Angiotensin II	11
1.1.2. DAS RENIN-ANGIOTENSIN-ALDOSTERON-SYSTEM AUßERHALB DER NIERE	13
1.1.3. DIE PHARMAKOLOGISCHEN ANSATZPUNKTE DER RAAS-BLOCKADE	15
1.1.3.1. ACE-Hemmer	15
1.1.3.2. AT ₁ -Rezeptor-Antagonisten	15
1.1.3.3. Aldosteron-Antagonisten	16
1.2. ALISKIREN UND SEINE IN-VITRO UND IN-VIVO WIRKUNGEN	16
1.3. FRAGESTELLUNG UND METHODISCHER ANSATZ	18
2. MATERIAL UND METHODEN	21
2.1. MATERIALIEN	21
2.1.1. LÖSUNGEN UND SUBSTANZEN	21
2.1.1.1. Präparierlösung	21
2.1.1.2. Modifizierte Lösung nach Krebs-Henseleit	21
2.1.1.3. Aliskiren	22
2.1.1.4. Vasopressin - ADH	23
2.1.1.5. Angiotensin II	23
2.1.1.6. Erhöhung der extrazellulären Kalium-Konzentration und kardioplege Lösung	24
2.1.1.7. Losartan	25
2.1.1.8. Tetraethylammonium (TEA)	25
2.1.1.9. Apamin	25
2.1.1.10. Glibenclamid	25
2.1.1.11. Dendrotoxin	26
2.1.1.12. Charybdotoxin	26
2.1.1.13. Cromakalim (BRL 34915)	26
2.1.1.14. Noradrenalin	26
2.1.1.15. Propranolol	27
2.1.1.16. Bisoprolol	27
2.1.1.17. ICI 118 551	27
2.1.2. VERSUCHSTIERE	27
2.1.2.1. Präparation für das Organbad	27
2.1.2.2. Präparation für die Langendorff-Apparatur	28
2.2. METHODEN	29
2.2.1. MESSUNG DER MECHANISCHEN AKTIVITÄT IM ORGANBAD	29
2.2.1.1. Versuchsaufbau	29
2.2.1.2. Versuchsdurchführung	30
2.2.1.3. Auswertung der mechanischen Aktivität	31
2.2.2. MESSUNG DER HERZFUNKTION IN DER LANGENDORFF-APPARATUR	31
2.2.2.1. Versuchsaufbau	31
2.2.2.2. Versuchsdurchführung	33
2.2.2.3. Perfusionsdruck	34
2.2.2.4. Linksventrikulärer Druck	34
2.2.2.5. Elektrokardiogramm	35
2.2.2.6. Auswertung der Herzaktivität	35
2.2.3. STATISTIK UND ERGEBNISDARSTELLUNG	35

3. ERGEBNISSE	38
3.1. DIE WIRKUNG VON ALISKIREN AUF DEN TONUS DER GLATTMUSKULÄREN GEFÄßMUSKULATUR DER ARTERIA ILIACA	38
3.1.1. DIE WIRKUNG VON ALISKIREN UNTER VASOPRESSIN-VORAKTIVIERUNG	38
3.1.2. DIE WIRKUNG VON ALISKIREN UNTER ERHÖHTER EXTRAZELLULÄRE KALIUM-KONZENTRATION	44
3.2. DIE WIRKUNG VON ALISKIREN AUF DEN TONUS DER GLATTMUSKULÄREN GEFÄßMUSKULATUR DER AORTA ABDOMINALIS	45
3.2.1. DIE WIRKUNG VON ALISKIREN UNTER VASOPRESSIN-VORAKTIVIERUNG	45
3.2.2. ERHÖHTE EXTRAZELLULÄRE KALIUM-KONZENTRATION	47
3.3. DIE WIRKUNG VON ALISKIREN AUF DEN TONUS UND DIE SPONTANAKTIVITÄT DER PORTALVENE	48
3.3.1. DIE WIRKUNG VON ALISKIREN UNTER VASOPRESSIN-VORAKTIVIERUNG	48
3.3.2. ERHÖHTE EXTRAZELLULÄRE KALIUM-KONZENTRATION	52
3.3.3. ALLEINIGE ALISKIREN-APPLIKATION	53
3.3.4. HYPOTHESE DER KALIUM-KANAL-VERMITTELTEN WIRKUNG	56
3.4. DIE WIRKUNG VON ALISKIREN AM LANGENDORFF-HERZEN	60
3.4.1. DIE WIRKUNG VON ALISKIREN UNTER VASOPRESSIN-VORAKTIVIERUNG	60
3.4.2. DIE WIRKUNG VON ALISKIREN UNTER KALIUM-VORAKTIVIERUNG	63
3.4.3. ALLEINIGE ALISKIREN-APPLIKATION	64
3.4.4. HYPOTHESE DER RAAS-VERMITTELTEN WIRKUNG	68
3.4.5. HYPOTHESE DER BETA-ADRENOZEPTOR-VERMITTELTEN WIRKUNG	69
4. DISKUSSION	74
4.1. DISKUSSION DER METHODIK	74
4.1.1. DIE METHODIK DES ORGANBAD	74
4.1.2. DIE METHODIK DES LANGENDORFF-HERZEN	75
4.2. DISKUSSION DER ERGEBNISSE	76
4.2.1. DIE WIRKUNG VON ALISKIREN AUF DIE TONISCHE AKTIVITÄT DER GLATTEN GEFÄßMUSKULATUR DER A. ILIACA UND DER AORTA ABDOMINALIS	76
4.3. DIE WIRKUNG VON ALISKIREN AUF DIE PHASISCHE AKTIVITÄT DER GLATTEN GEFÄßMUSKULATUR DER PORTALVENE	79
4.4. DIE WIRKUNG VON ALISKIREN AM LANGENDORFF-HERZEN	82
5. ZUSAMMENFASSUNG	84
6. THESEN	86
7. LITERATURVERZEICHNIS	88
8. ANHANG	101
8.1. ERGÄNZENDE MATERIALIEN ZUM HAUPTTEXT	101

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

ABBILDUNGEN

Abb. 1: Schematische Abbildung des Regelkreislaufes des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems

Abb. 2: Schematischer Versuchsaufbau des Organbads

Abb. 3: Schematischer Versuchsaufbau der Langendorff-Apparatur

Abb. 4: Dosis-Wirkungsbeziehung von Vasopressin

Abb. 5: Originalaufzeichnung einer Messdurchführung der A. iliaca

Abb. 6: Quantitative Analyse der durch Aliskiren verursachten Vasodilatation an der A. iliaca

Abb. 7: Vergleich Time-matched-Kontrolle mit aufsteigender Aliskiren-Konzentration

Abb. 8: Vergleich der Aliskiren-Wirkung zwischen der ersten und zweiten Versuchsdurchführung an der A. iliaca

Abb. 9: Dosis-Wirkungsbeziehungen der Einzelexperimente sowie deren Mittelwert unter Kalium-Voraktivierung an der A. iliaca

Abb. 10: Originalaufzeichnung einer Messdurchführung der Aorta abdominalis

Abb. 11: Quantitative Analyse der durch Aliskiren verursachten Vasodilatation an der Aorta

Abb. 12: Quantitative Analyse der Aliskiren-vermittelten Effekte an der Aorta

Abb. 13: Originalaufzeichnung einer Messdurchführung an der Portalvene

Abb. 14: Dosis-Wirkungsbeziehung der Aliskiren-vermittelten Wirkung auf die mechanische Aktivität des basalen Tonus sowie die Charakteristika der Spontanaktivität Frequenz, Amplitude und Dauer einer Kontraktion

Abb. 15: Dosis-Wirkungsbeziehung der Aliskiren-vermittelten Effekte an der Portalvene unter Kalium-Voraktivierung

Abb. 16. Originalaufzeichnung einer Messdurchführung der Portalvene ohne jegliche Voraktivierung:

Abb. 17: Quantitative Analyse der Aliskiren-vermittelten Effekte bei alleiniger Applikation von Aliskiren an der Portalvene auf die Frequenz der Spontanaktivität

Abb. 18: Quantitative Analyse der Aliskiren-vermittelten Effekte bei alleiniger Applikation von Aliskiren an der Portalvene auf die mechanische Aktivität und Charakteristika der Spontanaktivität Amplitude und Dauer einer Kontraktion

Abb. 19: Originalaufzeichnung einer Messdurchführung an der Portalvene mit Kalium-Kanal-Antagonisten

Abb. 20: Originalaufzeichnung einer Messdurchführung des Kalium-20mmol/l - Kalium-80mmol/l - Test an der Portalvene

Abb. 21: Originalaufzeichnung des Perfusionsdruckes einer Messdurchführung am Langendorff-Herz

Abb. 22: Quantitative Analyse der Aliskiren-vermittelten Effekte am Langendorff-Herzen unter Vasopressin-Voraktivierung

Abb. 23: Quantitative Analyse des Aliskiren-vermittelten Effekts am Langendorff-Herzen unter Voraktivierung mit Kalium 20 mmol/l

Abb. 24: Originalaufzeichnung einer Messdurchführung an der Langendorff-Apparatur

Abb. 25: Quantitative Analyse der Aliskiren-vermittelten Effekte bei alleiniger Applikation von Aliskiren am Langendorff-Herz auf den Perfusionsdruck sowie die Frequenz und Kontraktionskraft

Abb. 26: Vergleich des Perfusionsdruckes unter Voraktivierung mit Aliskiren beziehungsweise Kalium im Vergleich zur Kontrollbedingung ohne Voraktivierung zu den obenstehenden Zeitpunkten

Abb. 27: Vergleich der Dosis-Wirkungsbeziehungen der Zunahme des Perfusionsdruckes unter alleiniger aufsteigender Aliskiren-Applikation im Vergleich zu aufsteigenden Aliskiren-Konzentrationen unter zusätzlicher RAAS-Blockade über Losartan 10 $\mu\text{mol/l}$

Abb. 28: Quantitative Analyse der Zunahme des Perfusionsdruckes unter alleiniger Aliskiren-Applikation im Vergleich zu zusätzlicher β -Blockade mittels ICI 118551, Bisoprolol, der Kombination beider sowie Propranolol

Abb. 29: Quantitative Analyse der Abnahme der Herzfrequenz unter alleiniger Aliskiren-Applikation im Vergleich zu zusätzlicher β -Blockade mittels ICI 118551, Bisoprolol, der Kombination beider sowie Propranolol

Abb. 30: Quantitative Analyse der Zunahme der Kontraktionskraft unter alleiniger Aliskiren-Applikation im Vergleich zu zusätzlicher β -Blockade mittels ICI 118551, Bisoprolol, der Kombination beider sowie Propranolol

TABELLEN

Tab. 1: Zusammensetzung der Präparierlösung

Tab. 2: Zusammensetzung der modifizierten Lösung nach Krebs-Henseleit

Tab. 3: Dosisabhängige Aliskiren-Wirkung auf die A. iliaca inklusive Signifikanzniveau

Tab. 4: Dosisabhängige Aliskiren-Wirkung auf die Aorta abdominalis inklusive Signifikanzniveau

Tab. 5: Dosisabhängige Aliskiren-Wirkung auf die Portalvene

Tab. 6: Zusammenfassung der Kalium-Kanal-Antagonisten sowie ihrer Wirkung an der Portalvene

Tab. 7: Dosisabhängige Aliskiren-Wirkung auf den Perfusionsdruck des Langendorff-Herzen unter Vasopressin-Voraktivierung

Tab. 8: Dosisabhängige Aliskiren-Wirkung auf den Perfusionsdruck des Langendorff-Herzen unter Kalium-Voraktivierung

1. EINLEITUNG, STAND DER WISSENSCHAFT UND FRAGESTELLUNG

Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie Myokardinfarkte, Herzinsuffizienz oder zerebrale Ischämien und Blutungen stellen seit vielen Jahren die führende Todesursache in Deutschland dar (39% für 2015, Statistisches Bundesamt, www.destatis.de). Ihnen zu meist gemein ist dabei die arterielle Hypertonie als Wegbereiter von Komplikationen und Folgeerkrankungen. Die förderliche und präventive Wirkung der Behandlung der arteriellen Hypertonie konnte in zahlreichen Studien nachgewiesen werden (Macmahon et al. 1990; Lewington et al. 2002; Law et al. 2009).

Im gesunden Organismus nimmt das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) (Abbildung (Abb.) 1) eine zentrale Rolle für die Regulation des Blutdrucks, des extrazellulären Volumens sowie der Perfusion des Gewebes ein (Laragh and Sealey 1992; Atlas 2007). Zahlreiche Studien konnten zudem eine wesentliche Beteiligung des RAA-Systems an der Pathogenese arterieller Hypertonie, Arteriosklerose sowie Herzinsuffizienz nachweisen (Ferrario 2006; Atlas 2007).

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, ein aus Enzymen und Hormonen bestehender Regelkreislauf, ist der zentrale Stellmechanismus des Organismus für die Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes und damit einhergehend für die Blutdruckregulation. In seiner physiologischen Rolle bewahrt es den Körper vor Hypotension und Hypovolämie. Dabei führt eine Reduktion der Nierendurchblutung zur Aktivierung der Kaskade und Freisetzung des Enzyms Renin aus dem juxtaglomerulären Apparat der Niere. Im initialen geschwindigkeits- und umsatzbestimmenden Schritt bewirkt Renin die Umwandlung von Angiotensinogen in Angiotensin I. Letzteres ist selbst Substrat für die Bildung von Angiotensin II durch das in der Lunge produzierte Angiotensin-Converting-Enzym (ACE). Angiotensin II wiederum ist der primäre Effektor der Signalkaskade und vermittelt einerseits mannigfaltige Wirkungen - auf welche im späteren Verlauf der Arbeit detailliert eingegangen werden soll - direkt über Angiotensin II-Rezeptoren, andererseits fördert es aber auch die Bildung von Aldosteron in der Nebenniere und führt zur Freisetzung von Vasopressin aus dem Hypophysenhinterlappen (vgl. Abb. 1).

Zwar entfaltet das RAAS, wie bereits erwähnt, seine Wirkung vornehmlich über Angiotensin II, jedoch gilt der Initiator Renin als der umsatzbestimmende Faktor des Regelkreislaufs (Skeggs et al. 1957; Staessen et al. 2006; Atlas 2007; Imanishi et al. 2008).

Auch wenn Renin bereits 1898 erstmals von Tigerstedt und Bergman beschrieben wurde (Tigerstedt and Bergman 1898; Marks and Maxwell 1979; Flavahan et al. 2016; Gu et al. 2016), gelang es erst wieder 1934 durch die Arbeiten von Harry Goldblatt und Kollegen zu wissenschaftlichem Interesse und rückte erst in den vergangenen fünf Jahrzehnten in den Fokus der klinischen Aufmerksamkeit. So nahm das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System in den folgenden Jahren eine Schlüsselstellung in der Herz-Kreislauf-Forschung an und wurde zu einem der wichtigsten Ansatzpunkte der Entwicklung antihypertensiver Medikamente und Therapieempfehlungen bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen.

Nachdem sich Präparate, welche erst in spätere Prozesse der RAAS-Signalkaskade eingreifen - wie beispielsweise Inhibitoren des Angiotensin-Converting-Enzyms (Franzosi et al. 1998; Flather et al. 2000) und Antagonisten am Angiotensin II-Typ I-Rezeptor (Lewis et al. 2001; Lee et al. 2004) - bereits auf dem Arzneimittelmarkt etabliert hatten und zusätzlich einige Renin-Inhibitoren entwickelt worden waren, welche bislang jedoch nur im experimentellen Setting einsetzbar waren (Delabays et al. 1989; Wood et al. 1989; Kobrin et al. 1993; Rongen et al. 1995; Wood et al. 2005), wurde im März 2007 mit Aliskiren (Rahuel et al. 2000; Stanton et al. 2003) der erste direkte Renin-Inhibitor für die orale Hypertoniebehandlung durch die amerikanische Food And Drug Administration zugelassen. Im August 2007 folgte die Zulassung für die Europäische Union und wurde in der medizinischen Gemeinschaft euphorisch begrüßt, führten die bisherigen Agentien von ACE-Inhibitoren und ARB zu einer reflektorischen Erhöhung der Ausgangsprodukte und damit nur zu einer unvollständigen Blockade des RAAS (Juillerat et al. 1990; Azizi et al. 1995; Mazzolai et al. 1999; Staessen et al. 2006). Der primäre Effekt von Aliskiren, die Inhibition der Hydrolyse von Angiotensinogen zu Angiotensin I, greift an der Schlüsselposition des RAAS an und führt zu einer vollständigen Blockade aller Folgeprozesse und resultiert damit in einer Abnahme des systemischen Blutdruckes (Rahuel et al. 2000; Stanton et al. 2003; Wood et al. 2003).

Da das RAAS auch über die arterielle Hypertonie hinaus an der Pathophysiologie von beispielsweise Arteriosklerose, Nephropathie und Herzinsuffizienz beteiligt ist (Atlas 2007), konnte für ACE-Inhibitoren (Pfeffer et al. 1992; SOLVD Investigators et al. 1992; FoxEUropean trial On reduction of cardiac events with Perindopril in stable coronary Artery disease Investigators 2003; Klingbeil et al. 2003; López-Sendón et al. 2004) und ARB (Sutter 1990; Navalkar et al. 2001; Dahlöf et al. 2002; Koh et al. 2003; Pfeffer et al. 2003; Liao et al. 2012) bereits ein therapeutischer Nutzen im Rahmen der obenstehenden Erkrankungen nachgewiesen werden, welcher über die alleinige Blutdrucksenkung hinaus zu gehen scheint (Dickstein et al. 2002; Atlas 2007). Jedoch führt die mit diesen Substanzen vergesellschaftete

reflektorische Hochregulation des RAAS wohlmöglich zu einer Selbstlimitation der therapeutischen Effektivität.

Auch für Aliskiren, von welchem man sich im Gegensatz zu ACE-Inhibitoren und ARB eine vollständige Hemmung des RAAS erwartete, konnte in experimentellen Arbeiten ein positiver Effekt auf strukturelle und funktionelle Veränderungen beispielsweise im Rahmen zerebraler oder myokardialer Ischämien, unabhängig der Blutdrucksenkung, nachgewiesen werden (Pilz et al. 2005; Westermann et al. 2008; Rashikh et al. 2011; 2012; Miao et al. 2016).

Jahrzehntelang galt es als allgemein gültig, dass das RAAS vornehmlich renal lokalisiert ist. Jedoch kamen zunehmend Hinweise auf, welche die Hypothese eines lokalen Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems in weiteren Organen wie dem Herzen aber auch Gefäßen belegen (Linz et al. 1992; Danser and Schalekamp 1996; Danser 2010; Riet et al. 2015).

Auf der Grundlage eines lokalen RAAS soll es das Ziel dieser Arbeit sein, die Wirkung des direkten Renin-Inhibitors Aliskiren auf isolierte, für das Herz-Kreislauf-System zentrale Organe zu charakterisieren.

1.1. DAS RENIN-ANGIOTENSIN-ALDOSTERON-SYSTEM UND SEINE PHARMAKOLOGISCHEN ZIELSTRUKTUREN

1.1.1. Die Renin-Angiotensin-Aldosteron-Signalkaskade

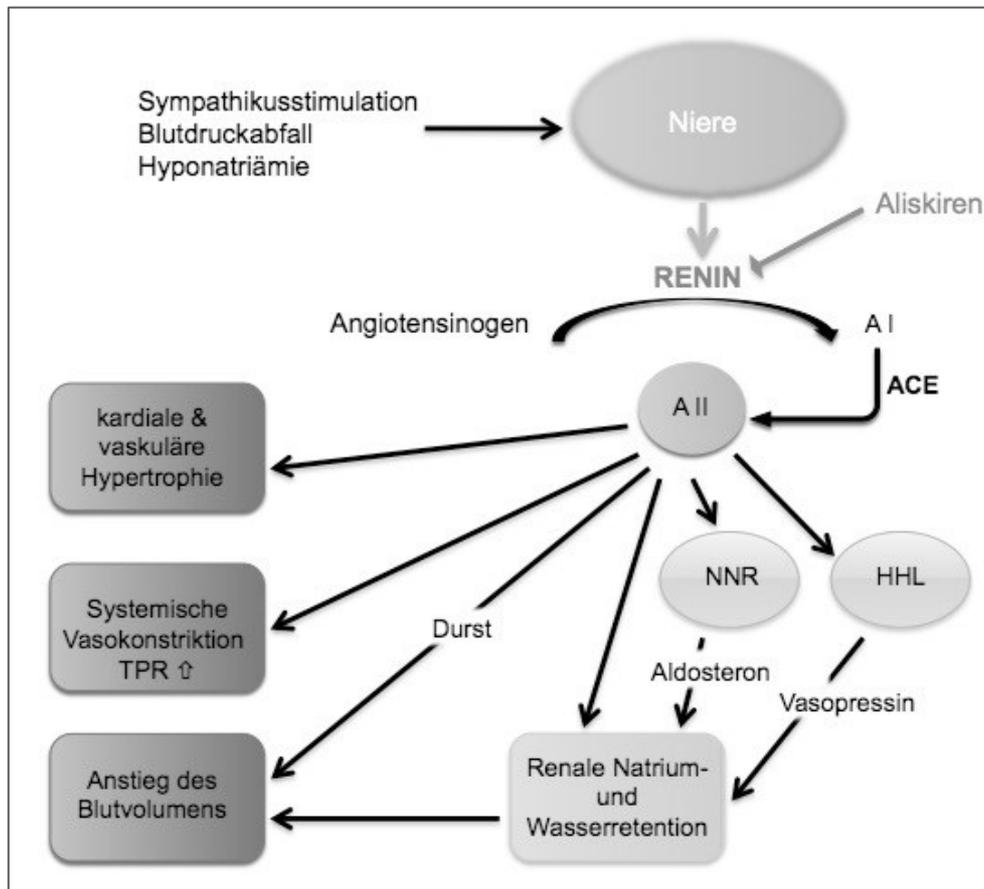


Abb. 1: Schematische Abbildung des Regelkreislaufes des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems

1.1.1.1. Renin, Prorenin und der (Pro)renin-Rezeptor

Die RAA-Signalkaskade beginnt mit der Biosynthese der Endopeptidase Renin in den Zellen des juxtaglomerulären Apparates der Niere. Renin wird als Preprohormon Prorenin synthetisiert und durch proteolytische Spaltung oder nicht-proteolytische Prozesse in Renin überführt (Danser and Deinum 2005; Atlas 2007). Aktives Renin wird in Granula in den Zellen des juxtaglomerulären Apparates gespeichert und in Abhängigkeit determinierter Stimuli sezerniert. Die Sekretion von Renin wird prinzipiell über vier Mechanismen reguliert: Eine Änderung des renalen Perfusionsdruckes, welcher über Barorezeptoren in den afferenten Arteriolen der Niere registriert wird, eine Änderung der NaCl-Konzentration in den Macula densa des distalen Tubulus, Beta-1-Adrenozeptor-vermittelte Sympathikusstimulation sowie ein negativer Feedback-Mechanismus über Angiotensin II (Brown 2006; Atlas 2007; Brown

2008). Darüber hinaus setzt die Niere auch Prorenin frei (Danser et al. 1998; Danser and Deinum 2005). Dieses steht unter physiologischen Bedingungen zumeist mit Renin in Balance, kann aber unter Umständen, beispielsweise bei diabetischer Retino- und Nephropathie, in deutlich höheren Konzentrationen als Renin im Plasma zirkulieren (Danser et al. 1989; Deinum et al. 1999; Danser and Deinum 2005).

Die Funktion von Prorenin ist bislang noch nicht endgültig verstanden. In vitro binden sowohl Renin als auch Prorenin an die (Pro)renin-Rezeptoren, von welchem bislang drei Subtypen beschrieben worden sind (van Kesteren et al. 1997; Admiraal et al. 1999; Saris et al. 2001; Nguyen et al. 2002; Peters et al. 2002). Zum einen resultiert die Bindung von Prorenin am (Pro)renin-Rezeptor in der Aktivierung von Prorenin zu Renin (Danser and Deinum 2005). Die Rezeptor-Bindung unterstützt aber nicht nur die Bildung von Angiotensin I, sondern aktiviert wahrscheinlich auch direkt Second-Messenger-Signalwege, wie beispielsweise G-Protein-gekoppelte Signalwege und so beinhalten Prorenin und Renin möglicherweise eigene agonistische Wirkungen (Groskopf et al. 1997; Di Bacco and Gill 2003; Danser and Deinum 2005).

Die Konzentration des freigesetzten Renins reguliert in seiner Schlüsselposition als ersten und umsatzlimitierenden Schritt der Kaskade die Aktivität des Renin-Angiotensin-Systems.

1.1.1.2. Von Angiotensinogen über Angiotensin I zu Angiotensin II

Angiotensinogen wird vornehmlich in der Leber synthetisiert, wobei Morgan und Kollegen zeigen konnten, dass die mRNA von Angiotensinogen in einer Reihe weiterer Gewebe wie Nieren-, Hirn- oder Gefäßgewebe nachgewiesen werden konnte (Morgan et al. 1996). Nach der Hydrolyse zu Angiotensin I wird das im Blutkreislauf zirkulierende Angiotensin I durch das Angiotensin-Converting-Enzym in der Lunge in seine aktive und potent vasokonstriktorische Form Angiotensin II gespalten (Atlas 2007).

Das ACE ist eine membranständige Exopeptidase und wird auf einer Reihe von Zellen wie beispielsweise Endothelzellen, Zellen des Bürstensaums im proximalen Tubulus der Niere sowie neuroepithelialen Zellen exprimiert. Die im Plasma gelöste Form der ACE stellt wahrscheinlich nur ein Abfallprodukt der membranständigen Form dar (Atlas 2007). Neben Angiotensin I spaltet das ACE auch die vasodilatatorischen Substanzen Bradykinin und Kallidin in ihre inaktiven Metaboliten (Linz et al. 1995; Carey and Siragy 2003).

Angiotensin II ist der Haupteffektor der Signalkaskade. Über Bindung an den Angiotensin II-Rezeptor vermittelt er eine Vielzahl physiologischer als auch pathophysiologisch relevanter Effekte mit Sofort-, Früh- und Langzeitwirkung an einer Reihe von Organen. Bislang sind vier Angiotensin II-Rezeptoren bekannt (Whitebread et al. 1989; Speth and Kim 1990; Timmermans et al. 1993), wobei die relevanten Effekte primär über den AT₁-Rezeptor vermittelt werden (Touyz and Schiffrin 2000). So kommt es im Herz-Kreislaufsystem als Sofort- beziehungsweise Früheffekt zu einer Vasokonstriktion und dadurch zu einem Anstieg des Blutdrucks und der kardialen Kontraktilität. Als Langzeitwirkung führt es über die Aktivierung von Tyrosinkinase-vermittelten Signalwegen zu einer Zellvermehrung und -migration sowie Fibrosierung und Inflammation (Touyz and Schiffrin 2000; Atlas 2007).

Letztere spielen auch bei kardiovaskulären Erkrankungen und dem strukturellen Remodelling, welches mit diesen einhergeht, eine entscheidende Rolle. Die Bedeutung von Angiotensin II für die Pathogenese der arteriellen Hypertonie wird auch durch eine Reihe experimenteller und klinischer Studien hervorgehoben, welche zeigen konnten, dass ACE-Hemmer und AT₁-Rezeptor-Antagonisten nicht nur zu einer Abnahme des Blutdrucks führten, sondern auch strukturelle und funktionelle Anomalitäten der Gefäßwand sowie des Herzen zurückbildeten (Schiffrin 1996; Li et al. 1997; Rizzoni et al. 1998; Schiffrin et al. 2000; Touyz and Schiffrin 2000).

In den Nierentubuli führt Angiotensin II unter anderem zu einer Natrium- und Volumenretention sowie zu einer Inhibition der Reninfreisetzung. In der Nebenniere stimuliert es die Aldosteronsynthese und -freisetzung (Atlas 2007).

Aldosteron wiederum bewirkt in den Verbindungstubuli und Sammelrohren der Niere über die Aktivierung des Mineralokortikoidrezeptors einen vermehrten Einbau von Natrium (ENaC)-Kanälen sowie der Natrium/Kalium-ATPase. Auf diese Weise wird der Natriumrücktransport aus den Tubuli erleichtert und die Wasserrückresorption gesteigert. Ferner kommt es zu einem vermehrten Ausscheiden von Kalium und Ammonium (Schrier et al. 2010). Auf der anderen Seite führt eine Situation chronisch erhöhter Aldosteronplasmaspiegel zu profibrotischen Wirkungen (Funder 2001; Brem 2009). Additiv zu den proliferativen Prozessen, welche im RAAS primär durch Angiotensin II vermittelt werden, konnte die pathophysiologische Relevanz von Aldosteron-induzierten fibrotischen Umbauprozessen an den Zielorganen des Herzen, der Niere sowie an Gefäßen gezeigt werden (Funder 2001; Remuzzi et al. 2008).

1.1.2. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System außerhalb der Niere

Der Nachweis von Bestandteilen des RAAS sowie der Angiotensin II-Synthese in verschiedenen Geweben, die Entdeckung verschiedener Subtypen der AT-Rezeptoren und nicht zuletzt der Nachweis des (Pro)renin-Rezeptors haben dazu geführt, dass das klassische Verständnis des RAAS mit zirkulierendem Angiotensin II und seinem vornehmlichen Zielorgan der Niere um die Annahme eines lokalen RAAS in einer Vielzahl von Geweben erweitert worden ist.

Aus experimentellen Arbeiten gibt es Hinweise auf die Existenz eines lokalen RAA-Systems unter anderem im Gehirn, dem Verdauungstrakt, Auge, lymphatischen Gewebe und der Nebenniere (Van Kats et al. 2005; Paul 2006; Atlas 2007; Phillips and de Oliveira 2008).

Im Folgenden soll jedoch aus Gründen der Relevanz für diese Arbeit nur das lokale RAAS des Herzwesens und des Gefäßbettes näher beleuchtet werden.

Entgegen früheren Postulierungen, dass kardiales Gewebe Renin selbstständig synthetisieren kann, hat vor allem die Arbeitsgruppe um A. H. Jan Danser gezeigt, dass es sich am ehesten doch um renal produziertes Renin handelt, welches in die kardialen Zellen aufgenommen wird (Danser et al. 1994; De Lannoy et al. 1997; Katz et al. 1997; De Lannoy et al. 1998; Katz et al. 2001). So konnten Katz und Kollegen zeigen, dass nach bilateraler Nephrektomie im Tiermodell der Ratte keinerlei kardiale Reninaktivität mehr existiert (Van Esch et al. 2010). Darüber hinaus korrelieren die intrakardiale Renin-Konzentration und die Plasmarenin-Konzentration sehr eng miteinander (Danser et al. 1994).

Jedoch ist die Konzentration des kardialen Renins zu hoch, um allein durch das jeweils aktuell im Plasma der Koronararterien vorhandene Renin erklärt werden zu können (Danser 2010). Daher wird angenommen, dass kardiale Zellen aktiv zirkulierendes Renin beziehungsweise Prorenin über den (Pro)renin-Rezeptor internalisieren (Danser et al. 1994; 1997; Prescott et al. 2000; Saris et al. 2001; Danser 2010). Auf dieser Grundlage kann im Herzen eine selbstständige Angiotensin II-Produktion stattfinden. Van Kats und Kollegen konnten im Tiermodell des Schweins mittels Iod¹²⁵-markiertem Angiotensin zeigen, dass das kardiale Angiotensin II nahezu vollständig aus lokaler Produktion stammt (Van Kats et al. 1998). Dort wird es wahrscheinlich im interstitiellen Raum und an der Zelloberfläche gebildet (Saris et al. 2002; Chai and Danser 2005; Van Esch et al. 2010). Auch sollen unabhängige Angiotensin II-Synthesevorgänge existieren, welche nicht an das ACE gebunden sind und bei denen vor allem Serinproteasen wie Kallikrein-like Enzyme und Cathepsin G und Chymasen an der lokalen Produktion von Angiotensin II einen bedeutenden Anteil haben (Ihara et al.

1999; Carey and Siragy 2003; Atlas 2007; Phillips and de Oliveira 2008). Unter physiologischen Bedingungen liegt die Bedeutung des kardialen RAAS in der Proliferation, im Erhalt des zellulären Gleichgewichts mittels Inhibition und Förderung des Zellwachstums sowie der Adaptation auf äußere Reize wie beispielsweise Dehnung des Myokards (Paul 2006). Es sollte berücksichtigt werden, dass das kardiale RAAS, in einem pathologisch aktivierten Zustand, auch an der Pathogenese und der Erhaltung kardiovaskulärer Erkrankungen beteiligt sein kann (Pagliaro and Penna 2005; Atlas 2007).

In der glatten Gefäßmuskelzelle sowie in Endothelzellen wird Angiotensin wahrscheinlich ebenfalls wie oben beschrieben über die Aufnahme zirkulierenden renalen Renins generiert (Kifor and Dzau 1987; Hilgers et al. 2001; Carey and Siragy 2003; Atlas 2007). Auch wenn es Hinweise gibt, dass im Erkrankungsfall eine lokale Reninproduktion induziert werden kann (Iwai et al. 1997; Paul 2006). Während auf den glatten Gefäßmuskelzellen vornehmlich AT₁-Rezeptoren nachgewiesen werden konnten (Murphy et al. 1991), exprimieren Endothelzellen ebenfalls AT₂-Rezeptoren (Gohlke et al. 1998; Schuijt et al. 2001; Hannan et al. 2003; Batenburg et al. 2004; 2005). Dabei vermittelt Angiotensin II über die Bindung an den AT₁-Rezeptoren eine Vasokonstriktion (De Gasparo et al. 2000; Paul 2006) und aktiviert indirekt gleichzeitig andere Vasokonstriktoren wie Endothelin I (Rossi et al. 1999; Schiffrin 2005; Paul 2006), während die Bindung des AT₂-Rezeptors Proteinphosphatasen aktiviert und damit den vorher genannten Effekt antagonisiert (Gohlke et al. 1998; Nouet and Nahmias 2000; Batenburg et al. 2004; 2005; Walters et al. 2005).

Durch die oppositionellen Effekte beider Rezeptoren, welche weiter unten noch einmal ausführlich beschrieben werden, und die damit vermittelte Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen und Fibroblasten beteiligt sich das vaskuläre RAAS an dem Erhalt der kardiovaskulären Homöostase und des vaskulären Remodellings (Paul 2006; Atlas 2007).

Im pathologischen Zustand wird im vaskulären System das ACE hochreguliert, was möglicherweise in einer Dysbalance aus Vasodilatation und –konstriktion sowie Veränderung des Zellwachstums, Inflammation und Produktion reaktiver Sauerstoffspezien mündet (Pagliaro and Penna 2005; Atlas 2007). Für letztere wurde ein Zusammenhang mit Arteriosklerose, Remodelling, Hypertrophie und Angiogenese gezeigt (Paul 2006).

Zusammenfassend scheint das lokale RAAS eine komplementäre Funktion zum wohl bekannten zirkulierenden RAAS einzunehmen und dient unter den zum Teil gegensätzlichen systemischen Effekten dem Erhalt des Gleichgewichts im Gewebe (Paul 2006; Atlas 2007).

1.1.3. Die pharmakologischen Ansatzpunkte der RAAS-Blockade

1.1.3.1. ACE-Hemmer

Mit Captopril wurde 1981 sowohl der erste ACE-Inhibitor als auch das erste Medikament, welches direkt in das RAAS eingreift, zugelassen (Brunner et al. 1978; Case et al. 1978; Rubin et al. 1978). ACE-Inhibitoren hemmen das Angiotensin-Converting-Enzym und so die Umwandlung von Angiotensin I in Angiotensin II kompetitiv (Brown and Vaughan 1998; López-Sendón et al. 2004). Auf diese Weise reduzieren sie die zirkulierenden und lokalen Angiotensin II-Spiegel. Ebenfalls reduzieren sie die Aldosteron- und Vasopressin-Sekretion sowie den Sympathikotonus (López-Sendón et al. 2004; Atlas 2007). Jedoch beeinflussen sie nicht die Effekte, welche Angiotensin II über seine AT-Rezeptoren vermitteln, noch greifen sie in andere Schritte der RAA-Kaskade ein (López-Sendón et al. 2004). Das führt über einen negativen Feedback-Mechanismus zu einem Anstieg der Konzentrationen an Renin und Angiotensin I. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass es nach längerfristiger Einnahme wieder zu einem Anstieg von Angiotensin II und Aldosteron kommt (Pitt 1995; Atlas 2007). Ursächlich für diesen ‚ACE-Escape‘ kann zum einen die Umwandlung zu Angiotensin II über oben beschriebene alternative Wege wie beispielsweise die Chymase sein (Pitt 1995; López-Sendón et al. 2004). Auf der anderen Seite wäre es bei steigenden Renin- und Angiotensin I-Leveln auch denkbar, dass die hohen Angiotensin I-Spiegel die kompetitive Hemmung der ACE-Inhibitoren überwinden (Atlas et al. 1984; Atlas 2007).

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit des ACE zur Kininase II kommt es zusätzlich zu einer Inhibition der Kininase II und damit zu einem Anstieg von Bradykinin, welches wiederum zu einer vermehrten Freisetzung von Stickstoffmonoxid und vasoaktiven Prostaglandinen führt (Hornig et al. 1997; Linz et al. 1999; López-Sendón et al. 2004).

1.1.3.2. AT₁-Rezeptor-Antagonisten

Wie weiter oben bereits ausgeführt vermittelt Angiotensin II seine Wirkungen vornehmlich über den AT₁-Rezeptor. Diese Beobachtung führte in den frühen 1990er Jahren zur Entwicklung des ersten oral verfügbaren selektiven AT₁-Rezeptor-Blockers (ARB) Losartan (Ferrario 2006). Da ARB eine direkte Blockade der Angiotensin II-Wirkung auf Rezeptorebene hervorrufen, erhoffte man sich damit eine Blockade der Angiotensin II-vermittelten Effekte. Zwar kommt es unter Therapie mit ARB ebenfalls zu einem Anstieg der Renin-, Angiotensin I und auch Angiotensin II-Spiegel, doch, unabhängig des Syntheseweges

von Angiotensin II, kann dieses seine Effekte nicht mehr über den AT₁-Rezeptor entfalten (Sutter 1990). Wie oben erläutert entfalten jedoch auch die Vorprodukte der Angiotensinproduktion direkte Wirkung. Außerdem kann Angiotensin II prinzipiell ungehindert an alle anderen AT-Rezeptoren binden (Sutter 1990).

Die über AT₂-Rezeptor-Aktivierung weiter unten näher erläuterte Bradykinin/Stickstoffmonoxid/cGMP-Signalkaskade und damit vermeintlich nützliche Wirkung im Herz-Kreislauf-System konnte bislang nicht im klinischen Setting reproduziert werden (Carey and Siragy 2003; Atlas 2007).

1.1.3.3. Aldosteron-Antagonisten

Spironolacton und Eplerenon hemmen beide die Wirkung von Aldosteron auf Rezeptorebene (Ferrario 2006). Es konnte ein Nutzen in der Therapie der arteriellen Hypertonie sowie Herzinsuffizienz gezeigt werden (Ferrario 2006). Jedoch hemmen sie lediglich die durch Aldosteron-vermittelten Effekte auf das Herz-Kreislauf-System. Alle zuvor berichteten Angiotensin II-Wirkungen können ungehindert auftreten.

1.2. ALISKIREN UND SEINE IN-VITRO UND IN-VIVO WIRKUNGEN

Wie oben beschrieben führen sowohl ACE-Hemmer als auch ARB über den Wegfall eines negativen Feedback-Mechanismus zu einer Hochregulation des RAAS. Die daraus resultierenden erhöhten Plasmareninkonzentrationen und -aktivitäten führen möglicherweise zu einer selbstlimitierenden Wirkung.

Nicht zuletzt aus diesem Grund galt Aliskiren bei seiner Marktzulassung 2007 als Innovation und Hoffnung der antihypertensiven Therapie. Aliskiren besetzt das aktive Zentrum von Renin, kann aber auch Prorenin binden (Feldman et al. 2008) und führt somit zur Hemmung der Synthese von Angiotensin I aus Angiotensinogen und letztlich auch Angiotensin II (Pool et al. 2007; Brown 2008). Aufgrund des fehlenden Feedbacks von Angiotensin II kommt es auch unter Aliskiren-Therapie zu einem Anstieg der Plasmarenin-konzentration, jedoch nicht zum Anstieg der Reninaktivität (Pool et al. 2007; Brown 2008).

Die antihypertensive Wirkung und Sicherheit wurde bislang zahlreich belegt. So konnten Wood und Kollegen in tierexperimentellen Arbeiten zeigen, dass Aliskiren den Blutdruck ebenso effektiv senkt wie Valsartan und Benazepril (Wood et al. 2005). Ebenso konnte dies

mehrfach in klinischen Studien mit Aliskiren als Monotherapie oder in Kombination mit anderen etablierten Antihypertensiva bestätigt werden. Als Monotherapeutikum führt Aliskiren zu einer Reduktion des diastolischen und systolischen Blutdrucks, welche mit Irbesartan vergleichbar war (Gradman et al. 2005) mit einem Placebo-ähnlichen Nebenwirkungsprofil. Weitere Studien verglichen die antihypertensive Wirkung mit Ramipril (Duprez et al. 2008), Losartan (Stanton et al. 2003) und Hydrochlorothiazid (HCT) (Schmieder et al. 2009) und fanden eine vergleichbare beziehungsweise höhere Senkung des Blutdrucks bei ähnlichem Nebenwirkungsprofil. Auch die Kombinationstherapie aus Aliskiren und Valsartan (Pool et al. 2007), HCT (Schmieder et al. 2009) oder Amlodipin (Aliskiren and the Calcium Channel Blocker Amlodipin Combination as an Initial Treatment Strategy for Hypertension Control - ACCELERATE) (Brown et al. 2011) konnte eine effektivere Blutdrucksenkung als eine Monotherapie bei geringem Nebenwirkungsprofil zeigen.

Wie weiter oben erläutert, führt die erhöhte Produktion von Angiotensin II bei pathologischen Zuständen des Herzkreislaufsystems, wie beispielsweise Herzinsuffizienz, zu einem kardialen Remodelling und einer Dysfunktion. Eine Inhibition des RAAS ist daher ein essentieller Bestandteil der Therapie der Herzinsuffizienz. Unter dieser Prämisse konnte in vielen experimentellen Arbeiten ein kardioprotektiver Effekt von Aliskiren gezeigt werden: Whaley-Connell und Kollegen konnten in einem transgenen Rattenmodell für kardiale Dysfunktion zeigen, dass Aliskiren den strukturellen und funktionellen Verfall hemmt (Whaley-Connell et al. 2008). Am gleichen Modell fanden De Mello und Kollegen eine signifikante Reduktion des elektrischen Remodellings unabhängig der Senkung des Blutdrucks durch Aliskiren. Dabei war außerdem die perivaskuläre und interstitielle Fibrosierung deutlich reduziert (De Mello et al. 2013). Am Mausmodell des Myokardinfarktes ließen sich ferner eine verbesserte postischämische Herzfunktion sowie reduzierte kardiale Umbauvorgänge unter Aliskiren-Therapie nachweisen, welche ebenfalls unabhängig der Blutdrucksenkung schienen (Westermann et al. 2008).

Anfänglich schien sich der in tierexperimentellen Arbeiten nachweisliche Erfolg, auch in klinischen Studien reproduzieren zu lassen. Die Aliskiren Observation of Heart Failure Treatment (ALOFT)-Studie fand bei Kombination von Aliskiren mit einem ACE-Hemmer oder AT-Rezeptor-Blocker eine Reduktion der neurohormonalen Marker der Herzinsuffizienz bei Placebo-gleichem Nebenwirkungsprofil (McMurray et al. 2008). In der Aliskiren Left Ventricular Assessment of Hypertrophy (ALLAY)-Studie konnte für Aliskiren eine ebenso effektive Reduktion der linksventrikulären Masse wie für Losartan nachgewiesen werden.

Auch in Kombination mit Losartan berichteten die Autoren über eine gute Verträglichkeit (Solomon et al. 2009).

Jedoch wurde die vielversprechende Datenlage mit der vorzeitigen Beendigung und der Veröffentlichung der Ergebnisse der Aliskiren Trial in Type 2 Diabetes Using Cardiovascular and Renal Disease Endpoints (ALTITUDE)-Studie getrübt. Es zeigte sich, dass die Kombination aus ACE-Hemmer oder AT-Rezeptor-Antagonist mit Aliskiren bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ II zu einer gehäuften Anzahl an nicht-tödlichen Schlaganfall, renalen Komplikationen, Hyperkaliämie und Hypotonie bei nicht überlegenem Wirkungsprofil führte (Parving et al. 2012). Auch die Aliskiren Trial to Minimize OutcomeS in Patients with HEart failure (ATMOSPHERE)-Studie konnte keine aussichtsreicheren Ergebnisse liefern. Die Kombinationstherapie aus Aliskiren und Enalapril war der Monotherapie hinsichtlich der primären Endpunkte Tod und Hospitalisierung nicht überlegen und ging mit höheren Nebenwirkungen wie Hyperkaliämie, Kreatininanstieg und Hypotonie einher (McMurray et al. 2016).

1.3. FRAGESTELLUNG UND METHODISCHER ANSATZ

Im Fokus der vorliegenden Arbeit steht die Charakterisierung der Wirkung des direkten Renin-Inhibitors Aliskiren auf für das Herz-Kreislauf-System relevante isolierte Organen.

Während tierexperimentelle Arbeiten neben einer effektiven Blutdrucksenkung, einen zusätzlichen kardioprotektiven Effekt Aliskirens beschrieben haben (Wood et al. 2005; Whaley-Connell et al. 2008; De Mello et al. 2013), ist, wie zuvor dargestellt, die Datenlage hinsichtlich des systemischen Wirkungs- und Nebenwirkungsprofil im klinischen Einsatz und des Benefits für Patienten mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen widersprüchlich (Solomon et al. 2009; McMurray et al. 2016).

Neben diesen Patienten- und Probandenstudien beleuchten alle bis dato existierenden grundlagenwissenschaftlichen Arbeiten Teilaspekte der Wirkung von Aliskiren im systemischen Tiermodell oder auf zelluläre Ebene. Die vorliegende Arbeit stellt die erste uns bekannte funktionelle Charakterisierung der Wirkungsweise von Aliskiren an isolierten Organen dar.

Die dabei initial zum Einsatz gekommene Methode des Organbads erlaubt es im funktionell intakten Zellverband - und dennoch unabhängig von systemischen Einflüssen und Störfaktoren – das Wirkprofil einer Substanz zu charakterisieren.

Zudem führt die Auswahl der in der vorliegenden Arbeit verwendeten glattmuskulären Gefäßpräparate mit ihren unterschiedlichen physiologischen Eigenschaften zu einer möglichst umfassenden Charakterisierung der Wirkung. Mit der Aorta abdominalis sowie der Arteria iliaca einerseits und Portalvene andererseits wurden sowohl arterielle als auch venöse Gefäße mit ihren differenzierten, der physiologischen Funktion des entsprechenden Gefäßes spezialisiertem Wandaufbau abgebildet. Die Aorta abdominalis und Arteria iliaca repräsentieren dabei zentrale arterielle Gefäße. Dahingegen weist die Portalvene eine regelmäßige phasische, elektrische Spontanaktivität auf, welche die mechanische Aktivität und damit Gefäßkontraktion primär steuert (Funaki and Bohr 1964; Sutter 1990). Die Vermittlung zwischen elektrischer Erregung und mechanischer Kontraktion erfolgt vornehmlich durch den von Rezeptor- und spannungsabhängigen Ionenkanal vermittelten Einstrom von extrazellulären Calciumionen (Sutter 1990; Kamishima and McCarron 1996). Daraus ergibt sich, dass die hierbei beobachteten Veränderungen der mechanischen Aktivität auf eine Interaktion der untersuchten Substanz mit an der elektrischen Erregungsbildung beteiligten Ionenkanälen schließen lassen (Sutter 1990).

Die in der vorliegenden Arbeit im zweiten Schritt verwendete Methodik des Langendorff-Herzen erlaubt es funktionelle Aussagen über die pharmakologischen Effekte auf die myokardiale Funktion, die kardiale elektrisch rhythmische Aktivität sowie die vaskuläre Reaktivität der Koronararterien zu treffen. Außerdem zeichnet sich diese Herangehensweise der isolierten Herzpräparation durch einen Erhalt der maximalen physiologischen Funktionalität aus. Gleichzeitig erfolgen alle Messungen in Abwesenheit von möglicherweise verzerrenden systemischen oder peripheren Einflüssen anderer Organe (Liao et al. 2012).

Es ist darüber hinaus aufgrund der organschonenden Präparation und des Erhalts der physiologischen Funktion der Gewebe in beiden angewandten Methoden von der Unversehrtheit des Endothels in den Gefäßpräparaten beziehungsweise Koronararterien auszugehen. Dem Gefäßendothel mit seinen vasodilatatorischen (Prostacyclin PGI_2 , Stickstoffmonoxid, Endothelin, Bradykinin) und vasokonstriktorischen (Thromboxan A_2 , Endothelin) Faktoren wird eine wichtige Rolle in der Regulation des lokalen Gefäßtonus zugeschrieben (Moncada et al. 1976; Furchgott and Zawadzki 1980; Furchgott et al. 1984; Kiowski et al. 1991). In der Konsequenz lassen sich die durch Aliskiren beobachteten

Veränderungen gegebenenfalls auch auf eine Interaktion mit endothelabhängigen Faktoren zurückführen.

Auf diese Art und Weise kann in der vorliegenden Arbeit eine umfassende Aussage über makroskopische Gefäße, welche unterschiedlichste physiologische Eigenschaften besitzen und verschiedenen Organsysteme angehören, über mikroskopische Gefäße im Koronarsystem sowie über die Herzfunktion getroffen werden und so alle am Erhalt der Funktion des Herz-Kreislauf-Systems relevant beteiligten Organe abgebildet werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. MATERIALIEN

2.1.1. Lösungen und Substanzen

2.1.1.1. Präparierlösung

Für den Transport und die Reinigung der Präparate sowie die Grob- und Feinpräparation diente eine Lösung der unten stehenden Zusammensetzung (s. Tab. 1). Diese wurde vor jedem Versuch frisch aus den jeweiligen Stammlösungen zubereitet und bei 4°C im Kühlschrank über die Zeit des Versuchsablaufes aufbewahrt.

Salz	Konzentration Stammlösung [mmol/l]	Konzentration Präparierlösung [mmol/l]	Anteil Stammlösung [ml] pro Liter Präparierlösung
NaCl	154	143	929
KCl	154	5,9	38
CaCl ₂ +2H ₂ O	110	3,6	33

Tab. 1: Zusammensetzung der Präparierlösung

2.1.1.2. Modifizierte Lösung nach Krebs-Henseleit

Während des eigentlichen Versuchsablaufes diente die folgende nach Krebs-Henseleit modifizierte physiologische Salzlösung als Nährlösung für die Präparate (s. Tab. 2). Wichtig ist zu erwähnen, dass die beschriebene Nährlösung sowohl im Organbad als auch in der Apparatur des Langendorff-Herzen als Nährlösung diente (Nakamura et al. 1999; Minasian et al. 2013).

Ebenso wie die Präparierlösung wurde auch die modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung vor jedem Experiment aus den untenstehenden Stammlösungen zubereitet und bei 4°C im Kühlschrank für die Versuchsdauer verwahrt.

Um einen Bakterienbefall zu vermeiden, wurde im Falle von Glucose auf eine Stammlösung verzichtet und diese für jeden Versuch neu angesetzt.

Da Calciumionen im alkalischen Milieu ausfallen, erfolgte die Zugabe der Calciumlösung erst nach Begasung der übrigen Krebs-Henseleit-Lösung mit Carbogen (95 O₂ und 5% CO₂).

Auch während des gesamten Versuchsablaufes erfolgte eine kontinuierliche Begasung der Perfusionslösung mit Carbogen. Diese diente zum einen der Sauerstoffversorgung des

Gewebes und zum anderen zur Stabilisierung des Bicarbonatpuffers für die Aufrechterhaltung eines physiologischen pH-Wertes von 7,4 (Golenhofen 1965; Golenhofen and Loh 1970; Milenov and Golenhofen 1983).

Salz	Konzentration Stammlösung [mmol/l]	Konzentration Nährlösung [mmol/l]	Anteil Stammlösung [ml] pro Liter Nährlösung
NaCl	154	112	727
NaHCO ₃	155	25	161
KH ₂ PO ₄	154	1,2	7,8
KCl	154	4,7	30,5
MgCl ₂ +6H ₂ O	110	1,2	11
CaCl ₂ +2H ₂ O	110	2,5	22,7
Glucose	300	11,5	38,3

Tab. 2: Zusammensetzung der modifizierten Lösung nach Krebs-Henseleit

Die für die Lösung verwendeten Salze wurden über die Firmen Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland), Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) und Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

2.1.1.3. Aliskiren

Bezüglich des Wirkmechanismus von Aliskiren (Novartis; Basel, Schweiz) wird auf die obenstehenden, ausführlichen Erläuterungen verwiesen.

Aliskiren wurde in Tablettenform bezogen und mittels Vortex-Schüttler (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) gründlich in destilliertem Wasser gelöst. Anschließend wurde die Lösung zur Filtration von etwaigen ungelösten Restbestandteilen durch ein Filterpapier gegeben.

Für die durchgeführten Experimente wurde Aliskiren in einer Dosierung von 1 µmol/ bis 50 µmol/l verwendet.

Die folgenden Testsubstanzen wurden zur experimentellen Charakterisierung von Aliskiren untersucht:

2.1.1.4. Vasopressin - ADH

Das Peptidhormon Vasopressin vermittelt seine Wirkung vornehmlich über seine spezifischen Rezeptoren V_{1a} , V_{1b} und V_2 . An glatten Muskelzellen der Gefäßmuskulatur sind primär V_{1a} -Rezeptoren repräsentiert (Mavani 2015), deren Bindung von Vasopressin zu einer Vasokonstriktion führt. Henderson und Kollegen gelang es zu zeigen, dass in Abhängigkeit der Konzentration des Vasopressin unterschiedliche Signaltransduktionsmechanismen an einer Konstriktion beteiligt sind (Henderson and Byron 2006). Unter Konzentrationen im nM-Bereich kommt es über die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) zu einer Inositol-1,4,5-triphosphat-vermittelten (IP_3) Calcium-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (Thibonnier 1992; Nemenoff 1998). Unter physiologischen Bedingungen liegen in vivo jedoch Konzentrationen im pM-Bereich vor. In diesem Fall scheint es zu einem PLC-unabhängigen intrazellulärem Calciumanstieg zu kommen. Eine Proteinkinase C-abhängige (PKC) Inhibition von spannungsabhängigen Kalium-Kanälen (K_v) und daraus resultierende Aktivierung von spannungsabhängigen L-Typ-Calcium-Kanälen (L-type VSCC) konnten gezeigt werden (Byron and Taylor 1995; Byron and Lucchesi 2002; Brueggemann et al. 2006; Henderson and Byron 2006).

Für die durchgeführten Experimente wurde Vasopressin (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) in einer Dosierung von 1 nmol/l bis 300 nmol/l verwendet.

2.1.1.5. Angiotensin II

Angiotensin II ist ein Octapeptid, welches nach Bindung an seinen Rezeptor sowohl Sofort-, Früh- als auch Langzeiteffekte auslöst (Touyz and Schiffrin 2000). Von den bekannten AT_1 , AT_2 , AT_3 und AT_4 -Rezeptoren sollen nur der AT_1 - und AT_2 -Rezeptor, welche auf Gefäßzellen exprimiert werden, betrachtet werden. Des Weiteren werden nur Sofort- und Früheffekte referiert, da Langzeiteffekte für die aktuellen experimentellen Betrachtungen keine Rolle spielen. Der AT_1 -Rezeptor ist ein G-Protein-gekoppelte Rezeptor, welcher über eine Reihe von Signalkaskaden, welche letztlich nicht bis ins Detail verstanden sind, unmittelbar eine Vasokonstriktion aus. An diesem Prozess beteiligt sind die G-Protein-gekoppelte Aktivierung der PLC und die damit verbundene Formation von IP_3 und Diacylglycerol (DAG), eine Erhöhung der freien intrazellulären Calcium-Konzentration durch Calcium-Einstrom und Freisetzung aus intrazellulären Speichern sowie die Aktivierung der PKC (Touyz and Schiffrin 2000). Des Weiteren spielen eine durch Stimulation des Na^+/H^+ -

Austauschers ausgelöste Alkalisierung des intrazellulären pH-Wertes, eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration von freiem Natrium und eine Reduktion der intrazellulären Konzentration des freien Magnesiums sowie eine Aktivierung der RhoA-Kinase über die Aktivierung der Protein-Tyrosin-Kinase-2 beta (Pyk 2) und SRC-Kinase, welche dann wiederum die Janus-Kinase 2 (JAK-2) aktiviert, eine Rolle (Touyz and Schiffrin 2000; Guilluy et al. 2010).

Zusätzlich stimuliert die Bindung von Angiotensin II am AT₁-Rezeptor auch die Bildung von anderen vasokonstriktorisches Substanzen, wie beispielsweise Endothelin I (Rossi et al. 1999; Schiffrin 2005; Paul 2006).

Demgegenüber führt die Aktivierung des AT₂-Rezeptors durch Bindung von Angiotensin II vornehmlich zu einer Vasodilatation, welche vor allem in tierexperimentellen Arbeiten aber auch an humanen koronaren Mikroarterien gezeigt werden konnte (Gohlke et al. 1998; Batenburg et al. 2004; 2005; Walters et al. 2005; Paul 2006). Dieser vasodilatatorische Effekt scheint vor allem über den Stickstoffmonoxid (NO)-cGMP-Signalweg vermittelt zu sein (Batenburg et al. 2005; Paul 2006).

Für die durchgeführten Experimente wurde Angiotensin II (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) in einer Dosierung von 1 nmol/l bis 300 nmol/l verwendet.

2.1.1.6. Erhöhung der extrazellulären Kalium-Konzentration und kardioplege Lösung

Eine Erhöhung der extrazellulären Kalium-Konzentration führt zu einer Verschiebung des Membranpotentials in Richtung Depolarisation und erhöht somit die Öffnungswahrscheinlichkeit von Calcium-Kanälen und löst damit eine Vasokonstriktion aus.

Am isolierten Herz der Wistar-Ratte in der Langendorff-Apparatur führt die Verwendung von Lösungen mit einer erhöhten Kaliumkonzentration zu einer Kardioplegie.

Für die durchgeführten Experimente am Langendorff-Herzen wurde eine extrazelluläre Kaliumkonzentrationen von 20mmol/l gewählt, im Sinne einer myokardialen Protektion wurde die kardioplege Lösung ebenfalls auf Basis der Nährlösung angesetzt (Nakamura et al. 1999; Minasian et al. 2013).

Für die durchgeführten Experimente im Organbad wurden extrazelluläre Kaliumkonzentrationen von 20 mmol/l, 40 mmol/l und 80 mmol/l gewählt.

2.1.1.7. Losartan

Losartan ist ein selektiver Angiotensin-Rezeptor-Antagonist mit hoher Affinität für den AT₁-Rezeptor und blockiert auf diese Weise die Angiotensin II-vermittelte Vasokonstriktion (Wexler et al. 1996; Carini et al. 1998).

Für die durchgeführten Experimente wurde Losartan (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) in einer Dosierung von 100 nmol/l bis 3 µmol/l verwendet.

2.1.1.8. Tetraethylammonium (TEA)

TEA ist ein Blocker verschiedener Ionenkanäle. Bei einer Konzentration von 1 mmol/l inhibiert es spezifisch BK_(Ca)-Kanäle, wird aber in höheren Konzentrationen zu einem unspezifischen Kaliumkanalblocker (Villarroel et al. 1988).

Für die durchgeführten Experimente wurde TEA (RBI, Berlin, Deutschland) in einer Konzentration von 1 mmol/l bis 10 mmol/l verwendet.

2.1.1.9. Apamin

Apamin bindet spezifisch an calciumabhängige Kaliumkanäle, SK-Kanäle, welche durch TEA nicht gehemmt werden können und blockiert diese (Haberman 1984).

In den durchgeführten Experimenten wurde Apamin (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) in einer Konzentration von 1 nmol/l bis 50 nmol/l eingesetzt.

2.1.1.10. Glibenclamid

Glibenclamid aus der Gruppe der Sulfonylharnstoffe ist ein spezifischer Blocker von K_{ATP}-Kanälen (Schmid-Antomarchi et al. 1987).

Die durchgeführten Experimente mit Glibenclamid (Alfa Aeser, Karlsruhe, Deutschland) erfolgten mit einer Dosierung von 1 µmol/l bis 50 µmol/l.

2.1.1.11. Dendrotoxin

Dendrotoxin bindet irreversibel an spannungsabhängige Kaliumkanäle, K_v -Kanäle, und hemmt diese (Harvey and Anderson 1985; Imredy and MacKinnon 2000).

Für die durchgeführten Experimente wurde Dendrotoxin (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) in einer Dosierung von 0,1 nmol/l bis 1 nmol/l verwendet.

2.1.1.12. Charybdotoxin

Das Polypeptid Charybdotoxin gilt als spezifischer Blocker an $IK_{(Ca)}$ - und $BK_{(Ca)}$ -Kanälen (Miller et al. 1985; Smith et al. 1986; Garcia et al. 1995).

Für die durchgeführten Experimente wurde Charybdotoxin (MoBiTec GmbH, Göttingen, Deutschland) in einer Dosierung von 0,1 nmol/l bis 0,5 nmol/l verwendet.

2.1.1.13. Cromakalim (BRL 34915)

Cromakalim öffnet spezifisch ATP-abhängige Kalium-Kanäle (Hamilton and Weir 1986; Sanguinetti et al. 1988).

In den erfolgten Experimenten wurde Cromakalim (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland) in einer Dosierung von 10 nmol/l bis 1 μ mol/l eingesetzt.

2.1.1.14. Noradrenalin

Noradrenalin vermittelt seine Wirkung über Adrenozeptoren, welche G-Protein-gekoppelte Rezeptoren darstellen und in α_1 -, α_2 -, β_1 -, β_2 - und β_3 -Adrenozeptoren unterteilt werden (Cherezov et al. 2007; Warne et al. 2008; Docherty 2009).

Noradrenalin führt vornehmlich über α_1 -Adrenozeptoren zu einer Vasokonstriktion an der peripheren glatten Gefäßmuskulatur. Der α_1 -Adrenozeptor ist ein G_q -Protein-gekoppelter Rezeptor, welcher über die Aktivierung der PLC zu einer IP_3 - und Diacylglycerol-vermittelten Calcium-Freisetzung führt (Docherty 2009).

Für die durchgeführten Experimente wurde Noradrenalin (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) in einer Konzentration von 0,1 μ mol/l bis 3 μ mol/l verwendet.

2.1.1.15. Propranolol

Propranolol ist ein seit langem bekannter nicht selektiver Betablocker (Prichard and Gillam 1964; Parratt 1967).

Für die durchgeführten Experimente wurde Propranolol (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) in einer Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$ bis 10 $\mu\text{mol/l}$ verwendet.

2.1.1.16. Bisoprolol

Bisoprolol ist ein selektiver β_1 -Adrenozeptor-Antagonist (Schliep and Harting 1984). Der β_1 -Adrenozeptor führt am Herzen zu einer positiven Inotropie und Chronotropie sowie zur Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems. Er ist ein G_s -Protein-gekoppelter Rezeptor, welcher die membranständige Adenylatcyclase aktiviert. Diese wiederum wandelt ATP in cAMP um, welches als ein Aktivator der Proteinkinase A (PKA) fungiert. Die Proteinkinase A phosphoryliert Calcium-Kanäle und erhöht damit ihre Öffnungswahrscheinlichkeit (Warne et al. 2008).

Für die durchgeführten Experimente wurde Bisoprolol (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) in einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ verwendet.

2.1.1.17. ICI 118 551

ICI 118 551 ist ein hoch spezifischer und selektiver β_2 -Adrenozeptor-Antagonist (O'Donnell and Wanstall 1980; Bilski et al. 1983).

β_2 -Adrenozeptor sind ebenfalls G_s -Protein-gekoppelte Rezeptoren und vermitteln ihre Wirkung über den bereits für β_1 -Adrenozeptoren beschriebenen Mechanismus.

Für die durchgeführten Experimente wurde ICI 118 551 (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) in einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ verwendet.

2.1.2. Versuchstiere

2.1.2.1. Präparation für das Organbad

32 männliche Ratten vom Stamm Wistar wurden nach Ether-Narkose durch Dekapitation mittels Guillotine getötet. Nach Eröffnung der Bauchdecke wurden die Aorta abdominalis und

ihre Teilungsstelle in die beiden Aa. iliacae communis auf einer Länge von 15 bis 20 mm dargestellt. Dabei wurden letztere an ihren Enden mit Garn umschlungen und festgeknotet. Nach vorsichtiger Entfernung makroskopisch sichtbarer Fett- und Bindegewebspartikel erfolgte die Entnahme des Präparats, bestehend aus beiden Aa. iliacae communis und Aorta abdominalis, und unmittelbare Überführung in die Präparierschalen mit gekühlter Präparierlösung.

Anschließend wurde ausgehend von der Leberpforte die Portalvene unter Vermeidung starker Zugbelastung auf einer Länge von 10 bis 15 mm präpariert. Die Fixation beider Enden mit Garn erleichterte zum einen das Entfernen von Fett- und Bindegewebe, als auch das Lösen der Portalvene aus dem Tier zur sofortigen Überführung in die Präparierschalen mit gekühlter Präparierlösung.

Unter dem Auflichtmikroskop erfolgte nach Fixierung des Präparats mittels feiner Stecknadeln die Feinpräparation unter Zuhilfenahme von Pinzetten, Pinzettenschere und Schere. Aufgrund der zuvor vorgenommenen Befestigung von Garn an den Enden des Präparats konnte das Präparat atraumatisch mit den Stecknadeln an den Fäden fixiert werden. Sowohl das restliche Fett- als auch Bindegewebe sowie Gefäßabgänge wurden entfernt.

Die Portalvene wurde längs inzidiert und verbleibende Blutkoagel ausgespült.

Die Aorta abdominalis und ihre Aufteilung in beide Aa. iliacae wurden nach Feinpräparation voneinander separiert und ebenfalls durch Spülung des Lumens von Blutkoageln befreit. Aufgrund der zirkulären Anordnung ihrer Gefäßmuskulatur wurde aus den erhaltenen Präparaten jeweils ein Spiralstreifen angefertigt.

Zur späteren Befestigung im Organbad wurden im nächsten Schritt die erhaltenen Präparate der Portalvene, Aa. iliacae communis und Aorta abdominalis an ihren Enden jeweils mit einem Faden versehen. Ein Faden wurde an einer Öse am unteren Ende eines Glashalters fixiert.

2.1.2.2. Präparation für die Langendorff-Apparatur

36 männliche Wistar-Ratten wurden nach Ether-Narkose durch Nackenschlag getötet. Zur Vermeidung einer Thrombenbildung in den Koronararterien und Ventrikeln erfolgte unmittelbar nach Thorakotomie eine gewichtsadaptierte (0,1ml/100g) Injektion von Heparin (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) in das Herz der Ratte. Nach der Darstellung der Aorta und Markierung mittels Fadens zur besseren Orientierung folgte die Durchtrennung der zu-

und abführenden Gefäße von kaudal nach kranial. Das Herz wurde dabei inklusive des Mediastinums und Anteilen der Lunge en bloc aus dem Tier gelöst.

Nach sofortiger Überführung des erhaltenen Präparats in eisgekühlte Präparierlösung kam es zu einem Herzstillstand.

Unter dem Auflichtmikroskop erfolgte die Resektion von Mediastinum, Fett- sowie Lungengewebe und anschließende Kanülierung der Aorta ascendens. Über die Kanüle wurden erneut mögliche verblieben Blutreste aus dem Herzen gespült.

Die Ischämiezeit betrug bei allen Versuchen von der Explantation des Herzen bis zur Reperfusion in der Langendorff-Apparatur durchschnittlich fünf Minuten.

2.2. METHODEN

2.2.1. Messung der mechanischen Aktivität im Organbad

2.2.1.1. Versuchsaufbau

Die verwendete Messapparatur bestand aus vier Organbädern, welche je zwei Präparate fassen konnten. Dabei folgte jedes Organbad dem gleichen Aufbau (s. Abb. 2). Ein doppelwandiges Glasgefäß, welches 40 ml fassen konnte, diente sowohl als Organbad als auch als Vorratsgefäß für frische Krebs-Henseleit-Lösung. Über einen Zulauf war je ein Vorratsgefäß mit einem Organbad verbunden. Eine Wärmepumpe (Lauda M3, Lab Extreme, Kent City, USA) sicherte einen permanenten Strom warmen Wassers im Hohlraum der doppelwandigen Gefäße. Auf diese Weise konnte eine konstante Temperatur von 37°C im Organbad und Vorratsgefäß gewährleistet werden. Mittels des bereits beschriebenen Zulaufs sowie einem von einer Membranpumpe angetriebenen Ablauf war ein rascher Austausch der Krebs-Henseleit-Lösung im Organbad möglich. Über in die Glaswand eingeschmolzene Mikrofilter erfolgte eine Begasung der Lösungen sowohl im Vorratsgefäß als auch im Organbad mit Carbogen.

Wie oben beschrieben wurden die Gefäßpräparate mittels Faden an einer Öse am unteren Ende eines Glashalters befestigt. Jener Glashalter wurde mit Hilfe einer Klemme außerhalb des Organbads so arretiert, dass die vertikal ausgerichteten Präparate im Organbad vollständig mit Lösung überdeckt waren. Das andere am Präparat zuvor befestigte Fadenende wurde an einem mechanischen Transducer (Swema SG4-90, Stockholm, Schweden) befestigt.

Die Transducer transferieren Längenänderung in ein elektrisches Signal. Das Signal wurde über einen Messverstärker (Hottinger Baldwin Messtechnik KWS 3073, Darmstadt, Deutschland) an einen Analog-Digital-Wandler (PowerLab 16/30, ADInstruments, Oxford, Groß Britannien) weitergeleitet, welcher mit einem handelsüblichen Computer (HP Compaq dc5800 Microtower) verbunden war. Das Aufzeichnen, Archivieren und Analysieren der Daten erfolgte mit der Software „LabChart“ (Version 6.1.1 und Version 8.1.2, ADInstruments, Oxford, Groß Britannien).

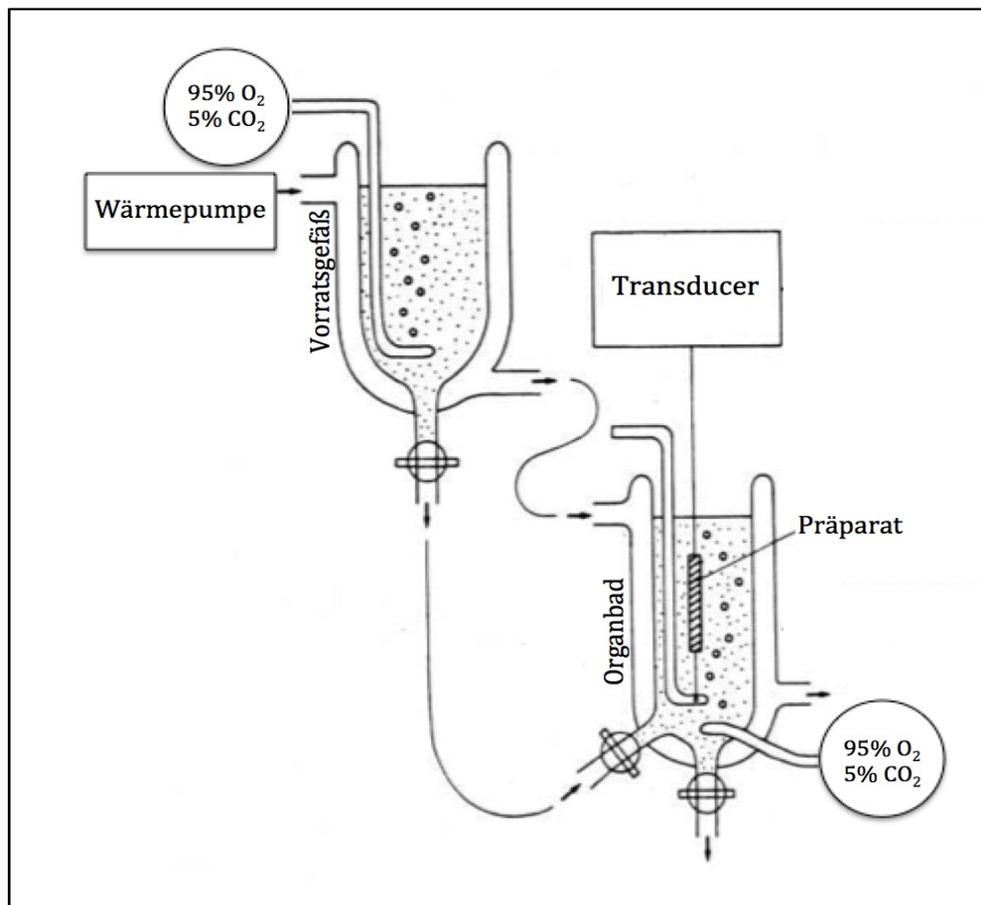


Abb. 2: Schematischer Versuchsaufbau des Organbads (modifiziert nach (Golenhofen 1983))

2.2.1.2. Versuchsdurchführung

Vor jedem Experiment wurden die Transducer mittels eines Messinggewichts (10mN) geeicht. In der oben beschriebenen Weise wurden die Gefäßpräparate unmittelbar nach ihrer Präparation mittels der Glashalter in das Organbad gehängt. In der Krebs-Henseleit-Lösung konnten die Präparate anschließend bei 37°C für eine Stunde akkommodieren. Nach dieser Anpassungsphase erfolgten ein Lösungswechsel und eine Vordehnung der Präparate auf 5 bis 10 mN.

Im Anschluss folgten die Messungen mit den Testsubstanzen. Die Applikation von Aliskiren erfolgte dabei nach einem kontrollierten Stufenschema in aufsteigender Konzentration von 1-50 $\mu\text{mol/l}$ (Aliskiren 1 $\mu\text{mol/l}$ \rightarrow Aliskiren 3 $\mu\text{mol/l}$ \rightarrow Aliskiren 5 $\mu\text{mol/l}$ \rightarrow Aliskiren 10 $\mu\text{mol/l}$ \rightarrow Aliskiren 30 $\mu\text{mol/l}$ \rightarrow Aliskiren 50 $\mu\text{mol/l}$). Zwischen jedem Konzentrationsschritt lag eine Zeit von durchschnittlich 15 Minuten. Nach einem vollständigen Messdurchlauf wurde das Präparat gespült, um gegebenenfalls eine weitere Messung durchführen zu können. Zwischen den einzelnen Messungen lag eine Pause von circa 15 Minuten.

2.2.1.3. Auswertung der mechanischen Aktivität

Zur Auswertung der Organbadversuche wurde die relative mechanische Aktivität [%], also das Verhältnis der gemessenen mechanischen Aktivität zur mechanischen Aktivität der Voraktivierung mittels Vasopressin oder kaliumreicher Lösung, beschrieben. Um dabei Verzerrungen im Rahmen von residuellen Unterschieden in der Wirkzeit zu vermeiden, wurde die mechanische Aktivität stets in Relation zu Zeit gesetzt.

Zusätzlich wird der endprozedurale Tonus, definiert als der Wert der mechanischen Aktivität, welcher nach Abschluss eines vollständigen Versuchsdurchlaufes gemessen werden konnte, sowie die Reagibilität, die noch vorhandene Reaktionsfähigkeit des Präparates nach einem vollständigen Versuchsdurchlauf, dargestellt.

2.2.2. Messung der Herzfunktion in der Langendorff-Apparatur

2.2.2.1. Versuchsaufbau

Die verwendete Langendorff-Apparatur (ADInstruments, Oxford, Groß Britannien) (s. Abb. 3) bestand aus einem Reservoir, in welches zwei separate Vorratsgefäße eingelassen waren. Über einen in den Boden der Vorratsgefäße eingelassenen Mikrofilter wurde die Begasung der Krebs-Henseleit-Lösung mit Carbogen garantiert. Eine im Reservoir befindliche und die Vorratsbehälter umspülende Flüssigkeit wurde über ein Thermostat auf konstante 37°C erwärmt. Aus den Vorratsbehältern wurde mittels Schläuchen über eine peristaltische Pumpe (The Minipuls 3, ADInstruments, Oxford, Groß Britannien) die Perfusion des isolierten Herzen gewährleistet. In einem der Aufhängung der Aortenkanüle vorgeschalteten doppelwandigen Block aus Schlauchwindungen erfolgte eine erneute

Erwärmung der Perfusionsflüssigkeit. Eine zweite peristaltische Pumpe gewährleistete den konstanten Fluss warmer Flüssigkeit aus dem Reservoir in den Hohlraum des doppelwandigen Blocks. Ebenfalls an diesem warmen Kreislauf beteiligt war ein doppelwandiges Gefäß unterhalb der Aufhängung des isolierten Herzens, welches zum einen die Perfusionsflüssigkeit auffing und zum anderen ein Auskühlen des Präparats verhinderte. Der Aortenkanüle vorgeschaltet befand sich ein mit dem System in Verbindung stehender Druck-Transducer (ADInstruments, Oxford, Groß Britannien). Ein weiterer Transducer gleicher Bauart war mit einem Ballonkatheter verbunden. Dieser wurde später über eine Inzision im linken Vorhof in den linken Ventrikel vorgeschoben. Beide Transducer übersetzten Druckänderungen in ein elektrisches Signal. Dieses wurde über eine Messbrücke (BridgeAmp, ADInstruments, Oxford, Groß Britannien) zu einem Analog-Digital-Wandler (PowerLab 8/35, ADInstruments, Oxford, Groß Britannien) weitergeleitet, welcher mit einem handelsüblichen Computer (HP Compaq dc5800 Microtower) verbunden war. Zusätzlich standen drei Federklemmelektroden zur Aufzeichnung der elektrischen Aktivität des isolierten Herzens bereit. Über einen Messverstärker (Animal Bio Amp, ADInstruments, Oxford, Groß Britannien) waren diese ebenfalls mit dem oben genannten Analog-Digital-Wandler verbunden. Das Aufzeichnen, Archivieren und Analysieren der Daten erfolgte mit der Software „LabChart“ (Version 6.1.1 und Version 8.1.2, ADInstruments, Oxford, Groß Britannien).

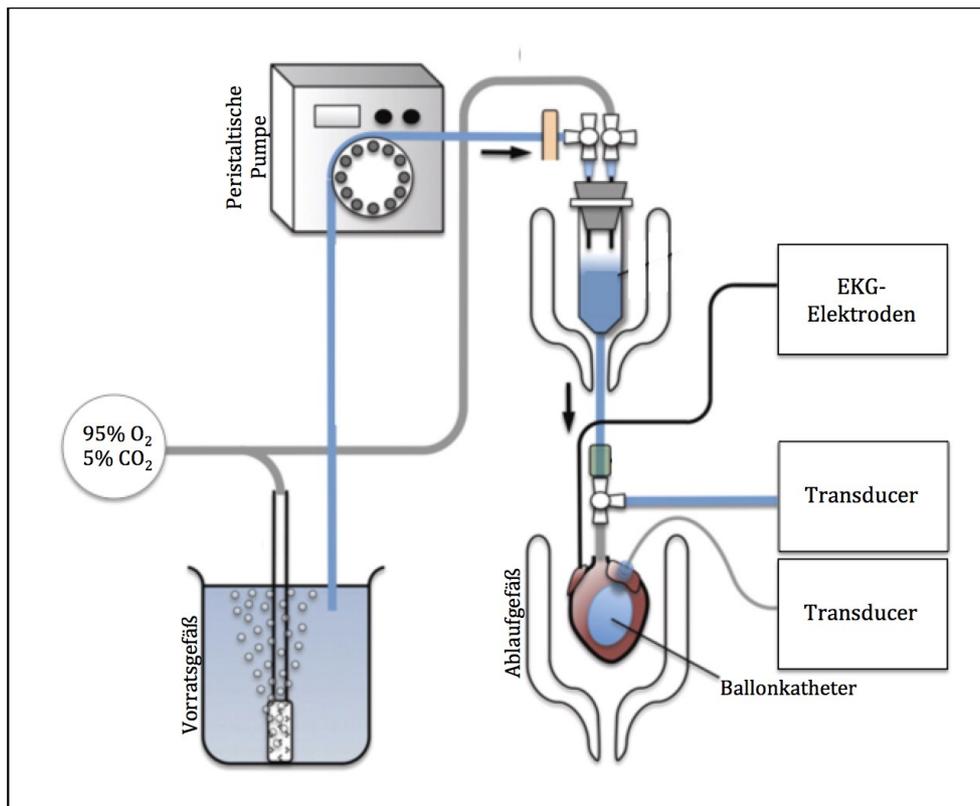


Abb. 3: Schematischer Versuchsaufbau der Langendorff-Apparatur (modifiziert nach (Liao et al. 2012))

2.2.2.2. Versuchsdurchführung

Vor jedem Experiment wurden Drucktransducer mittels Wassersäule geeicht. Dabei entsprachen 10 cm Wassersäule 7,36 mmHg. Außerdem wurde vor jeder Messung die peristaltische Pumpe, welche das isolierte Herz mit Nährlösung versorgte, auf eine Flussrate von 2 ml/min geeicht wurde.

Das isolierte Herz, welches wie oben beschrieben über den Aortenstumpf kanüliert worden war, wurde über jene Aortenkanüle in der Versuchsapparatur befestigt.

Unmittelbar nachdem das isolierte Herz mit der warmen Krebs-Henseleit-Lösung perfundiert wurde, begann es wieder zu schlagen. Über eine Schnittinzision des linken Vorhofes wurde der mit Wasser gefüllte Ballonkatheter bis in den linken Ventrikel vorgeschoben. Die Federklemmelektroden wurden mit der positiven Elektrode am rechten Vorhof, mit der negativen Elektrode an der Herzspitze und der Referenzelektrode an dem Metall der Kanüle angebracht. In der Krebs-Henseleit-Lösung konnten die Präparate anschließend bei 37°C für eine halbe Stunde akkomodieren.

Nach dieser Anpassungsphase erfolgten die Messungen mit den Testsubstanzen. Die Applikation von Aliskiren erfolgte nach einem festen Stufenschema in aufsteigender

Konzentration von 10-50 $\mu\text{mol/l}$ (Aliskiren 10 $\mu\text{mol/l}$ \rightarrow Aliskiren 30 $\mu\text{mol/l}$ \rightarrow Aliskiren 50 $\mu\text{mol/l}$). Zwischen jedem Konzentrationsschritt lag eine Zeit von durchschnittlich 10 Minuten. Nach einer Messung wurde das Präparat gespült, um eine weitere Messung durchführen zu können. Zwischen den einzelnen Messungen lag eine Pause von 10 Minuten.

2.2.2.3. Perfusionsdruck

Über die kanülierte Aorta ascendens erfolgte in der Langendorff-Apparatur eine retrograde Perfusion des isolierten Herzen, was zu einem Schluss der Aortenklappe und zu einer Perfusion des Koronarsystems führte. Über das venöse Koronarsystem und den Sinus coronarius fließt das Perfusat dann zurück in den rechten Vorhof und Ventrikel und tropft anschließend aus den Pulmonalarterien frei in das Auffangsystem.

Der gemessene Perfusionsdruck entspricht also dem Perfusionsdruck im Koronarsystem. Gemäß dem Ohm'schem Gesetz gilt:

$$U = I * R$$

(U=Perfusionsdruck; I=Perfusatfluss; R=Gefäßwiderstand)

Bei konstantem Perfusatfluss, welcher über die peristaltische Pumpe mit einer Flussrate von 2 ml/min sichergestellt wurde, verhält sich der Perfusionsdruck proportional zu dem Gefäßwiderstand.

Gemäß dem Hagen-Poiseuille'schen-Gesetz verhält sich der Widerstand eines Gefäßes umgekehrt proportional zur vierten Potenz des Gefäßradius:

$$R \sim \frac{1}{r^4}$$

(R=Gefäßwiderstand; r=Gefäßradius)

2.2.2.4. Linksventrikulärer Druck

Über den im linken Ventrikel befindlichen Ballonkatheter wurde der linksventrikuläre Druck registriert.

2.2.2.5. Elektrokardiogramm

Die elektrische Aktivität wurde über die Federklemmelektroden aufgezeichnet. Auf diese Weise konnte sowohl die Herzfrequenz als auch der Herzrhythmus aufgezeichnet werden.

2.2.2.6. Auswertung der Herzaktivität

Zur Auswertung der Langendorff-Versuche wurden der Perfusions- und linksventrikuläre Druck sowie die Herzfrequenz in Relation zu der Voraktivierung mit Vasopressin oder Kalium [%] beschrieben. Auch am Langendorff-Herzen wurden die Analysen des Perfusions- und linksventrikuläre Drucks unter Kontrolle der Wirkzeit vorgenommen. Anhand der Relation zu Zeit konnte ausgeschlossen werden, dass sich die beobachteten Effekte aus unterschiedliche Wirkzeiten erklären.

2.2.3. Statistik und Ergebnisdarstellung

Die statistischen Analysen erfolgten mit den Programmen SPSS 23.0 (SPSS Inc. 2015, IBM, Köln, Deutschland) sowie Excel 14.5.8 (Microsoft Excel für Mac 2011, Microsoft, Redmond, USA).

Wie bereits weiter oben erwähnt, wurde, um die Aliskiren-spezifischen Effekte zu ermessen, stets die Relation zu der entsprechenden Voraktivierung gebildet.

$$p = \frac{W}{G} * 100$$

p=Prozentsatz (Aliskiren-spezifischer Effekt), W=Prozentwert (absoluter Wert Aliskiren), G=Grundwert (absoluter Wert Voraktivierung)

Die Wirkung von Aliskiren innerhalb der unterschiedlichen Bedingungen wurde mittels mehrfaktorieller Varianzanalyse mit Messwiederholung (rm-ANOVA) mit den Innersubjektfaktoren ALISKIREN-DOSIERUNG (sechs Level: 1 µmol, 3, µmol, 5 µmol, 10 µmol, 30 µmol, 50 µmol) beurteilt. Anschließend wurden post-hoc t-Test verwendet, um signifikante Ergebnisse aufzuzeigen. Dabei wurde sowohl die jeweilige Konzentration gegen die Kontrollbedingung als auch gegen die benachbarte Konzentration gerechnet. Ein Ergebnis wurde als statistisch signifikant angesehen, wenn die errechnete Irrtumswahrscheinlichkeit

<5% betrug ($p < 0,05$). In Abhängigkeit der Fragestellung wurde der t-Test für verbundene oder für unabhängige Stichproben verwendet.

t-Test für verbundene Stichproben

$$t = \frac{|\bar{d}|}{s_d} * \sqrt{n}$$

($|\bar{d}|$ =Differenz der Mittelwerte der Variablen, s_d =Standardabweichung, n =Anzahl der Differenzen)

t-Test für unabhängige Stichproben

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s} * \sqrt{\frac{n_1 * n_2}{n_1 + n_2}}$$

(\bar{x}_1 und \bar{x}_2 =Mittelwert der Stichprobe, n_1 und n_2 =Stichprobengröße der Gruppe, $s = \sqrt{\frac{(n_1-1)*s_1^2 + (n_2-1)*s_2^2}{n_1+n_2-2}}$)

Die experimentellen Ergebnisse werden als arithmetische Mittelwerte der Einzelmessungen zu- beziehungsweise abzüglich des Standardfehlers des Mittelwerts (SEM) sowie der Angabe der Gesamtanzahl der ausgewerteten Ereignisse angegeben.

$$\bar{x} \pm SEM (n)$$

(\bar{x} =Mittelwert der Stichprobe, SEM=Standardfehler des Mittelwerts, n =Stichprobenumfang)

Mittelwert

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Standardfehler des Mittelwerts (SEM)

$$\sigma(\bar{x}_1) = \frac{s_d}{\sqrt{n}}$$

Standardabweichung

$$s_d = \sqrt{\frac{1}{n-1} * \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Statistisch signifikante Ergebnisse werden in den Abbildungen mit einem Stern (*, $p < 0,05$) beziehungsweise zwei Sternen (**, $p < 0,01$) markiert.

Da es bei der Testung multipler Hypothesen zu einer Kumulierung eines alpha-Fehlers kommt, wurde für multiple Vergleiche mittels False-Discovery-Rate (FDR) korrigiert (Benjamini and Hochberg 1995). Dabei erfolgt

$$FDR = E\left(\frac{V}{(V + S)}\right)$$

(E =erwartete Rate falscher Ablehnungen der Nullhypothese, V =Anzahl alpha-Fehler, S =Anzahl richtiger Ablehnungen der Nullhypothese)

3. ERGEBNISSE

3.1. DIE WIRKUNG VON ALISKIREN AUF DEN TONUS DER GLATTMUSKULÄREN GEFÄßMUSKULATUR DER ARTERIA ILIACA

3.1.1. Die Wirkung von Aliskiren unter Vasopressin-Voraktivierung

Aufgrund der oben beschriebenen zentralen Stellung von Vasopressin im Herz-Kreislaufsystem sowie seiner pathophysiologischen Bedeutung für Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems wurde die Wirkung von Aliskiren primär unter Voraktivierung mit Vasopressin untersucht.

Dabei wurde, um eine optimale Dosierung von Vasopressin als Voraktivierung zu finden, in Vorexperimenten die Dosis-Wirkungs-Beziehung an der A. iliaca untersucht (n=13) (siehe Abb. 4). Dabei konnte in nanomolaren, submaximalen Wirkungsbereichen eine dosisabhängige tonische Vasokonstriktion verzeichnet werden, während supramaximale Dosierungen wiederum zu einer Tonusabnahme führten.

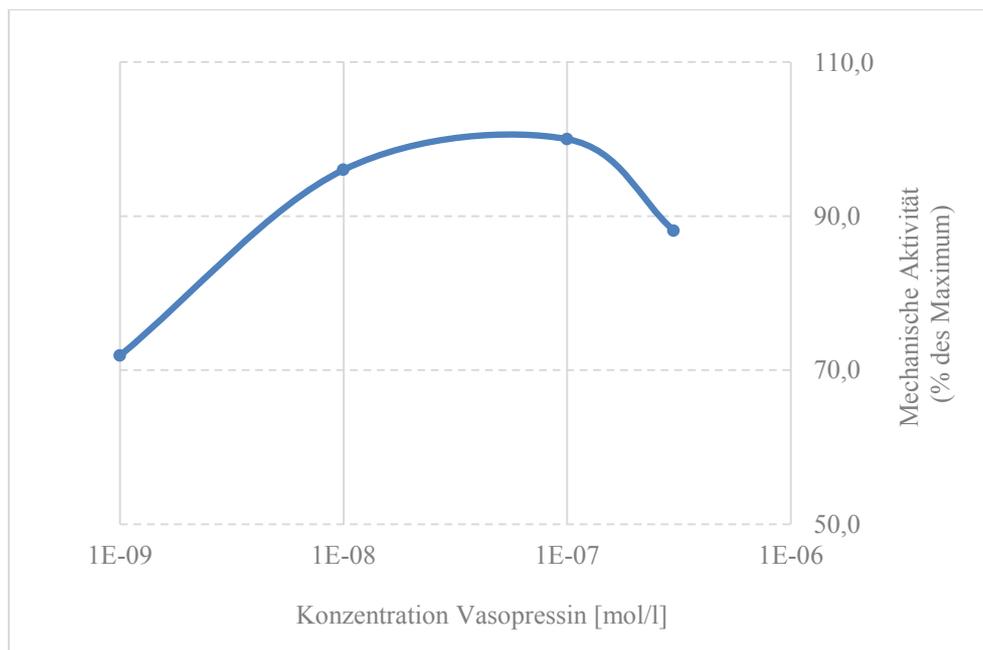


Abb. 4: Dosis-Wirkungsbeziehung von Vasopressin

Durch Zugabe von Vasopressin kam es in submaximalen Wirkungsbereichen zu einer tonischen Vasokonstriktion der A. iliaca. Unter supramaximaler Dosierung zeigte sich allerdings wiederum eine Tonusabnahme. Die Abszissenachse zeigt den negativen dekadischen Logarithmus der applizierten Vasopressin-Konzentration. Auf der y-Achse sind die Werte der mechanischen Aktivität als Prozentanteil des gemessenen Maximums der mechanischen Aktivität unter Vasopressin angegeben.

Folglich wurde für die Experimente mit Aliskiren eine Dosierung von Vasopressin von 3 nmol/l gewählt, welche in den Vorexperimenten zu einer zuverlässigen, jedoch nicht maximalen Vasokonstriktion geführt hatte.

Unter Voraktivierung mit 3 nmol/l Vasopressin führte Aliskiren zu einer Vasodilatation an der A. iliaca (s. Abb. 5). Dabei kam es initial zu einer steilen Zunahme des Vasotonus unter Vasopressin, welche nach einem Peak adaptierte, und anschließend führte Aliskiren dosisabhängig zu einer Vasodilatation.

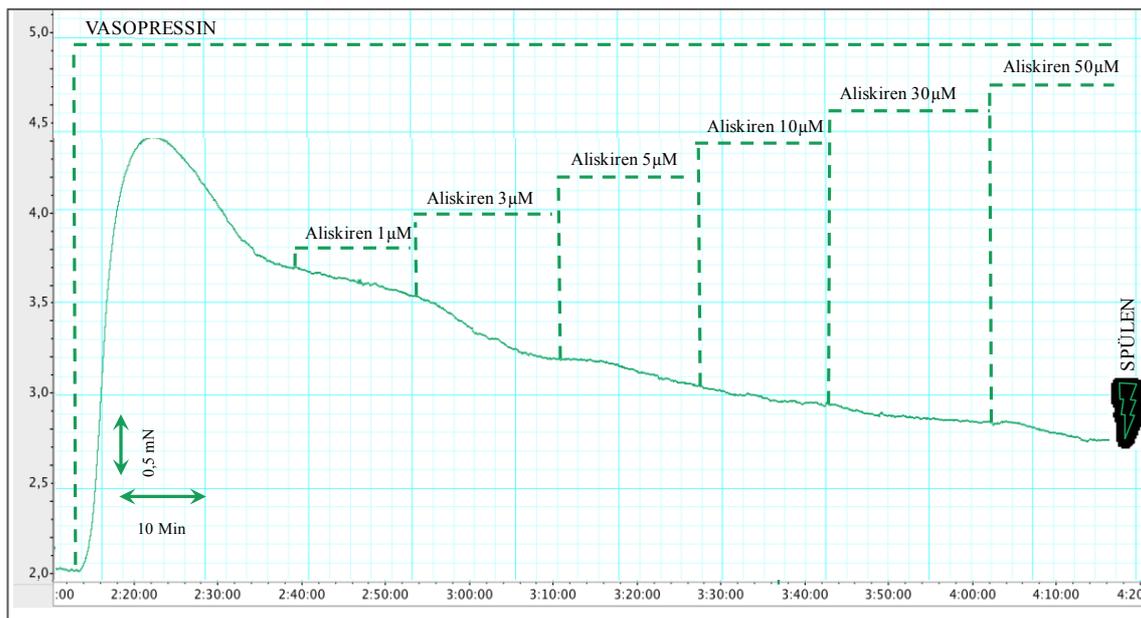


Abb. 5: Originalaufzeichnung einer Messdurchführung der A. iliaca

Das Gefäßpräparat der A. iliaca zeigte auf die Aktivierung mit Vasopressin initial eine steile Zunahme des Vasotonus, welcher nach einem Peak adaptierte. Dosisabhängig führte Aliskiren zu einer signifikanten Vasodilatation. Die x-Achse bildet die Zeit [Min] ab, die y-Achse die mechanische Aktivität [mN].

Dabei konnten wir für den Innersubjektfaktor ALISKIREN-DOSIERUNG einen signifikanten Haupteffekt ($F_{(5,40)}=10,82$, $p<0,001$) finden, was bedeutet, dass es unter Zugabe von Aliskiren an der A. iliaca zu einer signifikanten Vasodilatation nach Vasopressin-Voraktivierung kommt. Post-hoc t-Test zeigten, dass sich ab einer Konzentration von 3 µmol/l eine statistisch signifikante Tonusabnahme um circa 13% auf $87,3 \pm 2,1\%$ ($n=9$; $p=0,05$, FDR-korrigiert) verzeichnen lässt. Unter der höchsten verwendeten Aliskiren-Konzentration von 50 µmol/l kam es zu einer Vasodilatation um durchschnittlich 26% auf $73,9 \pm 5,5\%$ ($n=9$, $p=0,02$, unkorrigiert) (s. Abb. 6). Die Werte der übrigen Dosierungen inklusive Signifikanzniveau sind in der Tabelle 3 dargestellt.

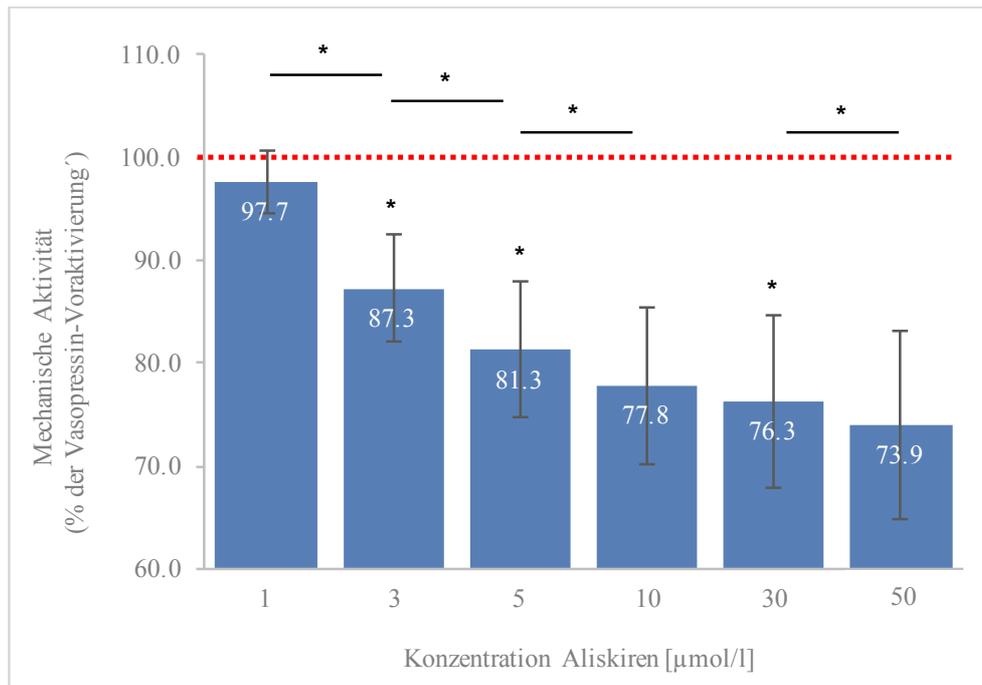


Abb. 6: Quantitative Analyse der durch Aliskiren verursachten Vasodilatation an der A. iliaca

Auf der Ordinate sind die Werte der mechanischen Aktivität als Prozentanteil des gemessenen Maximums der mechanischen Aktivität unter Vasopressin-Voraktivierung (3nmol/l) angegeben, veranschaulicht anhand der rot hervorgehobenen Linie. Die Fehlerindikatoren zeigen den SEM an, * $p < 0,05$, p-Werte FDR-korrigiert (zweiseitiger t-Test für verbundene Stichproben der jeweiligen Aliskiren-Dosierung zu Vasopressin, sowie zweiseitiger t-Test für verbundene Stichproben zwischen den entsprechenden Dosierungen), $n=9$.

Aliskirendosierung [µmol/l]	Mittelwert (Mechanische Aktivität [%])	Standardfehler (SEM)	Signifikanzniveau (p)	Signifikanzniveau, FDR-korrigiert
1	97,67	3,05	0,47	0,47
3	87,29	5,27	0,04	0,05
5	81,27	6,66	0,02	0,03
10	77,82	7,73	0,02	0,06
30	76,28	8,42	0,02	0,04
50	73,95	9,06	0,02	0,09

Tab. 3: Dosisabhängige Aliskiren-Wirkung auf die A. iliaca inklusive Signifikanzniveau

Wie beschrieben sowie in der Abbildung der Versuchsdurchführung (Abb. 5) ersichtlich, kam es nach Aktivierung des Präparats mit Vasopressin zu einem steilen Anstieg des Vasotonus, welcher nach einem Peak abfiel und langsam auf einem Niveau adaptierte. Um die Vasodilatation im Rahmen dieser Adaptationsvorgänge von der durch Aliskiren vermittelten Vasodilatation zu differenzieren, erfolgten in einem nächsten Schritt Kontrollexperimente

mittels Time-matched-Versuche. Dabei wurden parallel zu der Versuchsdurchführung mit Aliskiren die Gefäßpräparate der A. iliaca mit 3 nmol/l Vasopressin aktiviert, jedoch blieb im Falle der Time-matched-Kontrolle die darauffolgende Applikation von Aliskiren aus. Dementsprechend wurde ausschließlich die mechanische Antwort der Vasopressin-Voraktivierung beobachtet. Hervorzuheben ist, dass dieses über die gleiche Zeitabfolge geschah wie unter zusätzlich aufsteigenden Aliskiren-Konzentrationen

Wie auch unter Aliskiren kam es in beiden Fällen der Kontrollexperimente nach alleiniger Vasopressin-Applikation über den gesamten Zeitverlauf zu einer Vasodilatation. In beiden der zwei durchgeführten Kontrollexperimente fiel diese jedoch deutlich geringer aus als unter additiver Aliskiren-Applikation. Während der Vasotonus in einem ersten Time-matched-Versuch nur um 15,5% auf 84,5% der maximalen Vasopressin-Antwort abnahm, zeigte sich am zweiten Präparat lediglich eine Vasodilatation von 9,4% auf 90,6%. Auch wenn die Beobachtungen aufgrund des begrenzten Stichprobenumfangs nicht statistisch unterstrichen werden können, lässt der Vergleich von alleiniger Vasopressin-Aktivierung mit einer Abnahme des Vasotonus um im Mittel 12,5% auf $87,5 \pm 3,0\%$ gegenüber einer Vasodilatation von 26% auf $73,9 \pm 5,5\%$ unter Vasopressin-Aktivierung mit zusätzlicher Aliskiren-Applikation eine deutlich größere Abnahme des Vasotonus unter Aliskiren konstatieren (s. Abb. 7).

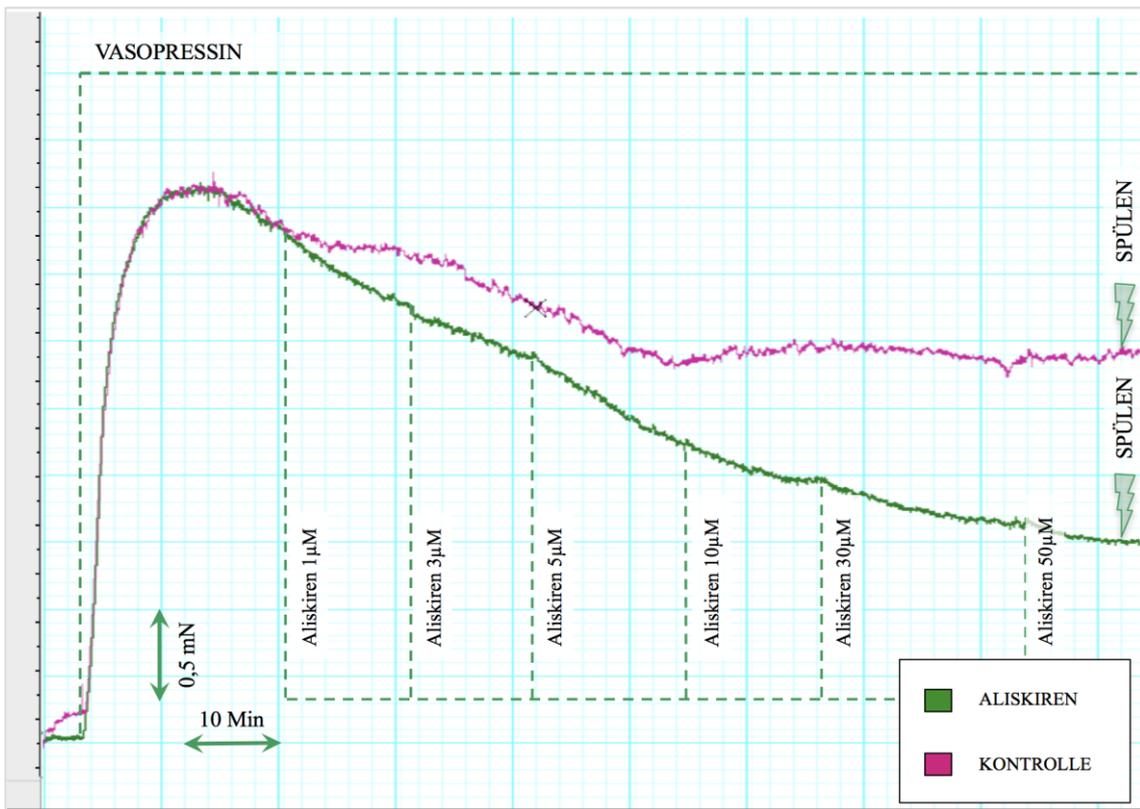


Abb. 7: Vergleich Time-matched-Kontrolle mit aufsteigender Aliskiren-Konzentration

Vergleich des Verlaufs der mechanischen Aktivität unter alleiniger Vasopressin-Voraktivierung (Kontrolle) mit jener unter anschließender zusätzlicher Aliskiren-Gabe. Zu Zwecken der Veranschaulichung wurden die Kurven der jeweiligen Originalaufzeichnung übereinandergelagt und die Zeitachse beider Kurven im Sinne Vergleichbarkeit aufeinander adaptiert. Die y-Achse bildet die mechanische Aktivität der Gefäßpräparate ab, die x-Achse die Zeit.

Der endprozedurale Tonus, definiert als Kraftwert, welcher nach dem Ausspülen der Substanzen nach einem vollständigen Versuchsdurchlauf (Vasopressin 3 nmol/l → Aliskiren 1 µmol/l → Aliskiren 3 µmol/l → Aliskiren 5 µmol/l → Aliskiren 10 µmol/l → Aliskiren 30 µmol/l → Aliskiren 50 µmol/l) gemessen werden kann, kann Veränderung der Grundaktivität sowie intrazelluläre Veränderungen der Präparate anzeigen.

Nach einmaliger Versuchsdurchführung lässt sich statistisch kein signifikanter Unterschied zwischen dem Tonus vor Beginn der Versuchsdurchführung und des endprozeduralen Tonus feststellen ($M_{\text{prä}}=2,5 \pm 0,5$ mN, $M_{\text{post}}=2,2 \pm 0,6$ mN, $n=9$, $p=0,73$, t-Test für verbundene Stichproben). Auch nach zweimaliger Versuchsdurchführung ist statistisch kein signifikanter Unterschied zwischen dem Tonus vor der ersten Substanzapplikation und des endprozeduralen Tonus zu verzeichnen ($M_{\text{prä}}=2,5 \pm 0,5$ mN, $n=9$, $M_{\text{post}}=1,8 \pm 0,7$, $n=6$, $p=0,4$, t-Test für verbundene Stichproben).

Die Reagibilität - die noch vorhandene Reaktionsfähigkeit des Präparates nach einem vollständigen Versuchsdurchlauf - vergleicht die Reaktionen einer zweiten Aliskiren-Aufdosierung unter Vasopressin-Voraktivierung mit den Gefäßantworten des ersten Versuchsdurchlaufs. Dabei beträgt die durch Vasopressin verursachte Vasokonstriktion bei einem zweiten Durchlauf $93,7 \pm 19,2\%$ der initialen Vasopressin-Antwort. Bezogen auf das jeweilige Vasopressin-Maximum kann in der zweiten Aliskiren-Versuchsreihe lediglich eine Reduktion des Gefäßtonus um $4,3 \pm 3,6\%$ unter der höchsten Aliskiren-Konzentration verzeichnet werden. Eine rm-ANOVA konnte für jene zweite Versuchsdurchführung keinen signifikanten Haupteffekt mehr für den Innersubjektfaktor ALISKIREN-DOSIERUNG ($F_{(5,20)}=1,34$, $p=0,31$) aufzeigen. Dementsprechend konnte in der zweiten Versuchsdurchführung keine signifikante Aliskiren-Wirkung an der A. iliaca mehr festgestellt werden. Die unterschiedliche Ausprägung der Wirkung von Aliskiren zwischen der ersten und zweiten Versuchsdurchführung wird ferner durch einen signifikanten Interaktionseffekt ALISKIREN-DOSIERUNG x APPLIKATION hervorgehoben ($F_{(5,60)}=2,23$, $p=0,03$) (Abb. 8). Insgesamt findet sich somit eine deutliche Abnahme der Reagibilität.

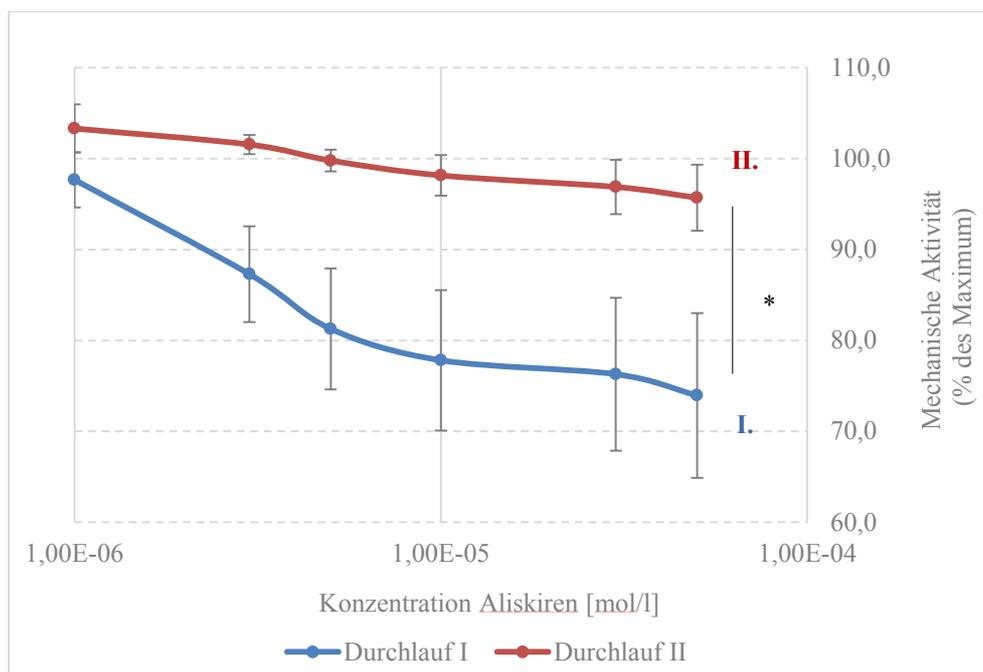


Abb. 8: Vergleich der Aliskiren-Wirkung zwischen der ersten und zweiten Versuchsdurchführung an der A. iliaca

Auf der y-Achse sind die Werte der mechanischen Aktivität als Prozentanteil des gemessenen Maximums der mechanischen Aktivität der jeweiligen Vasopressin-Voraktivierung (3nmol/l) angegeben. Die Fehlerindikatoren zeigen den SEM an, * $p<0,05$, Interaktionseffekt ALISKIREN-DOSIERUNG x APPLIKATION ($F_{(5,60)}=2,23$, $p=0,03$), $n=6$.

3.1.2. Die Wirkung von Aliskiren unter erhöhter extrazelluläre Kalium-Konzentration

Für eine elektrische Voraktivierung wurde eine extrazelluläre Kalium-Konzentration von 40 mmol/l gewählt. Da die durch Kalium vermittelte Vasokonstriktion als tonisch zu charakterisieren ist, eignet sie sich einerseits insbesondere für die Beschreibung vasodilatatorischer Agentien. Andererseits ermöglicht es die gewählte Konzentration von 40 mmol/l auch, weitere vasokonstriktorisches Effekte zu beobachten.

Insgesamt ist zu konstatieren, dass die Untersuchungen von Aliskiren unter Voraktivierung mit Kalium eine sehr heterogene Experimentenreihe darstellen (Abb. 9), sodass im Durchschnitt keine signifikante Wirkung von Aliskiren auf den Vasotonus beschrieben werden kann (rmANOVA: $F_{(5,25)}=0,32$, $p=0,89$, $n=5$) (Aliskiren 1 $\mu\text{mol/l}$: $98,1 \pm 2,4\%$; Aliskiren 50 $\mu\text{mol/l}$: $98,4 \pm 5,7\%$).

Auf Ebene der Einzelexperimente wird ersichtlich, dass es sowohl zu einer konzentrationsabhängigen Vasodilatation als auch -konstriktion unter aufsteigender Aliskiren-Dosierung gekommen ist (Abb. 9).

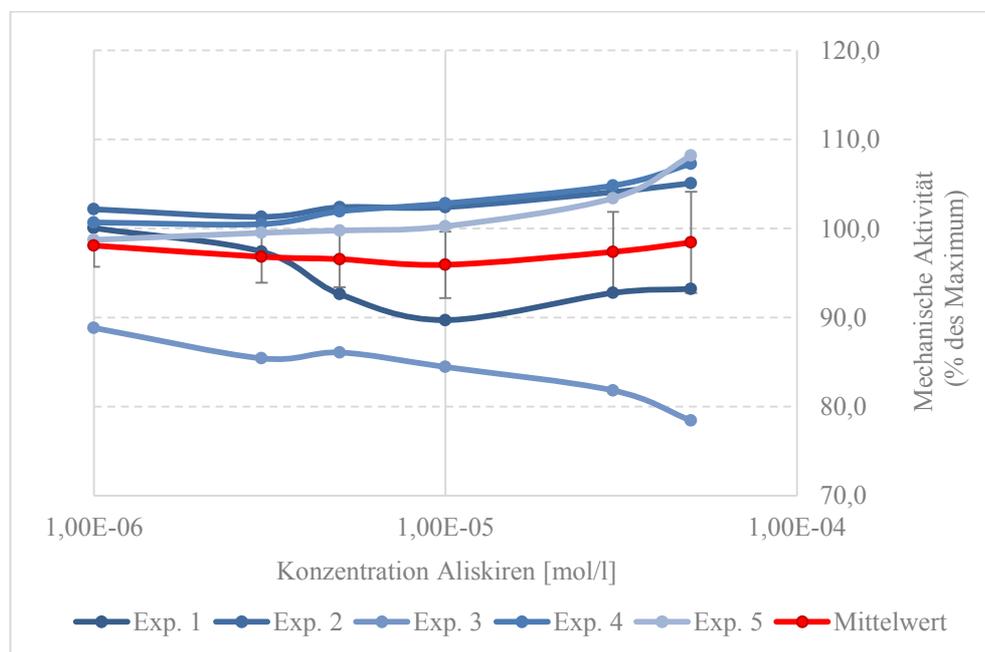


Abb. 9: Dosis-Wirkungsbeziehungen der Einzelexperimente sowie deren Mittelwert unter Kalium-Voraktivierung an der A. iliaca

Während in Experiment 2, 4 und 5 Aliskiren zu einer Zunahme des Vasotonus geführt hat, kann in Experiment 1 und 3 eine Abnahme des Vasotonus unter Kalium-Voraktivierung und aufsteigenden Aliskiren-Konzentrationen beobachtet werden. Auf der Ordinate sind die Werte der mechanischen Aktivität als Prozentanteil des gemessenen Maximums der mechanischen Aktivität unter Kalium angegeben. Auf der x-Achse ist die

verwendete Konzentration von Aliskiren abgetragen. Die Dosis-Wirkungsbeziehung der Mittelwerte lässt keinen signifikanten Effekt unter aufsteigender Aliskiren-Dosierung erkennen (rmANOVA: $F_{(5,25)}=0,32$, $p=0,89$). Die Fehlerindikatoren zeigen den SEM an, $n=5$.

Da unter Kalium-Voraktivierung an der A. iliaca kein Effekt von Aliskiren gezeigt werden konnte, wird auf die Analyse des endprozeduralen Tonus sowie der Reagibilität verzichtet.

3.2. DIE WIRKUNG VON ALISKIREN AUF DEN TONUS DER GLATTMUSKULÄREN GEFÄßMUSKULATUR DER AORTA ABDOMINALIS

3.2.1. Die Wirkung von Aliskiren unter Vasopressin-Voraktivierung

Auch an der Aorta abdominalis wurde die Wirkung von Aliskiren unter Voraktivierung mit Vasopressin untersucht. Dabei wurde ebenfalls wie an der A. iliaca eine Dosierung von 3 nmol/l Vasopressin gewählt.

Auch an der Aorta abdominalis fanden wir eine signifikante Wirkung von Aliskiren unter Vasopressin-Voraktivierung (rm-ANOVA: $F_{(5,30)}=6,19$, $p<0,001$) (s. Abb. 8). Ebenso wie an der A. iliaca konnte an der Aorta abdominalis eine konzentrationsabhängige Vasodilatation nachgewiesen werden. Unter der höchsten verwendeten Aliskiren-Konzentration von 50 $\mu\text{mol/l}$ kam es zu einer Abnahme des Vasotonus um durchschnittlich 23% auf $77,1 \pm 10,0\%$ ($n=7$) (s. Abb. 11). Die übrigen Werte der Abnahme der mechanischen Aktivität sind der Tabelle 4 sowie der Abbildung 11 zu entnehmen. Jedoch erreichten die Post-hoc-Analysen für 5, 10, 30 und 50 $\mu\text{mol/l}$ lediglich das Signifikanzniveau eines statistischen Trends ($p \leq 0,1$, vgl. Tab. 4).

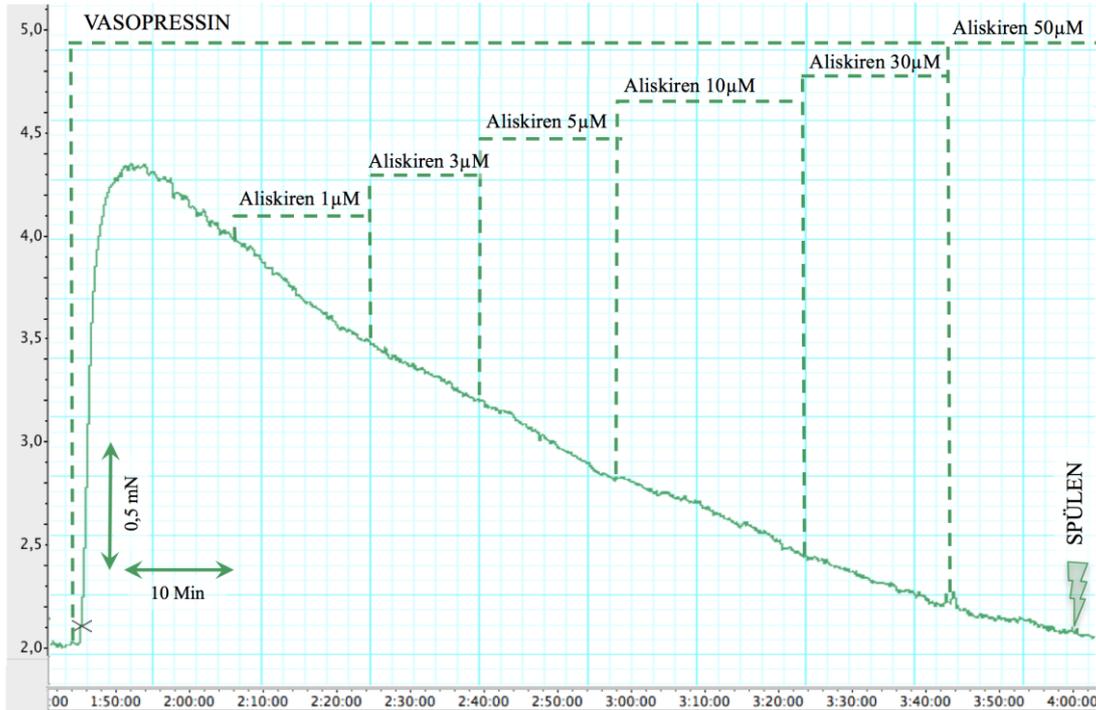


Abb. 10: Originalaufzeichnung einer Messdurchführung der Aorta abdominalis

Das Gefäßpräparat der Aorta abdominalis zeigt auf die Aktivierung mit Vasopressin initial eine steile Zunahme des Vasotonus, anschließend führt Aliskiren zu einer Vasodilatation (rm-ANOVA: $F_{(5,30)}=6,19$, $p<0,001$). Die x-Achse bildet die Zeit [Min] ab, die y-Achse die mechanische Aktivität [mN].

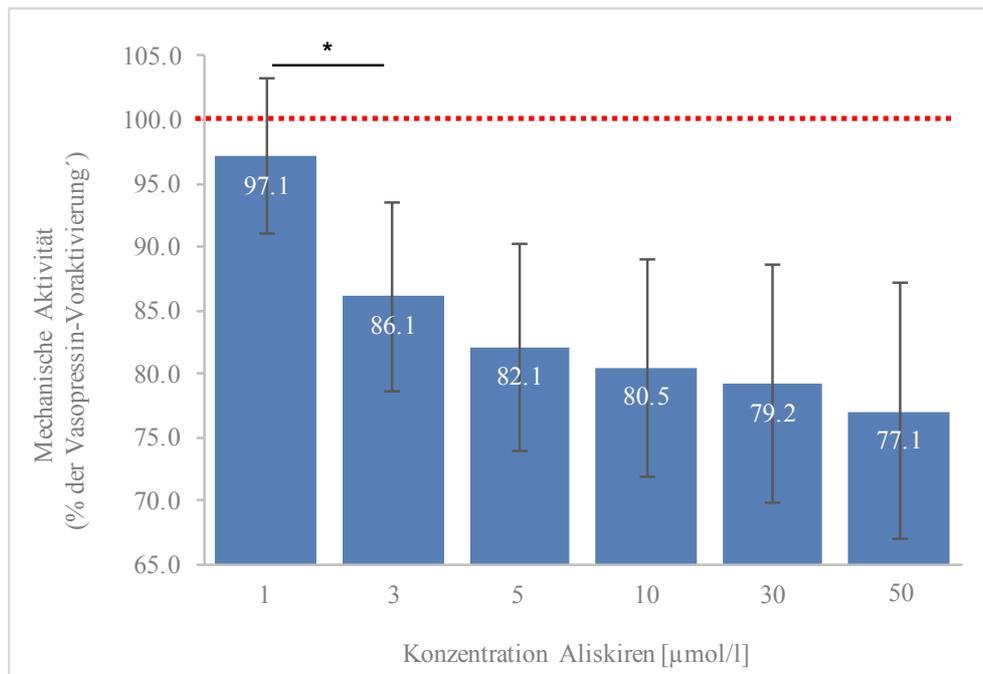


Abb. 11: Quantitative Analyse der durch Aliskiren verursachten Vasodilatation an der Aorta

Auf der Ordinate sind die Werte der mechanischen Aktivität als Prozentanteil des gemessenen Maximums der mechanischen Aktivität unter Vasopressin-Voraktivierung (3 nmol/l) angegeben, veranschaulicht anhand der rot

hervorgehobenen Linie. Die Fehlerindikatoren zeigen den SEM an, * $p < 0,05$, (zweiseitiger t-Test für verbundene Stichproben zwischen den entsprechenden Dosierungen), $n=7$.

Aliskirendosierung [$\mu\text{mol/l}$]	Mittelwert (Mechanische Aktivität [%])	Standardfehler (SEM)	Signifikanzniveau (p)
1	97,06	6,12	0,69
3	86,09	7,48	0,15
5	82,13	8,13	0,08
10	80,53	8,57	0,07
30	79,27	9,42	0,07
50	77,07	10,01	0,06

Tab. 4: Dosisabhängige Aliskiren-Wirkung auf die Aorta abdominalis inklusive Signifikanzniveau

Der endprozedurale Tonus nach einem vollständigen Versuchsdurchlauf weist keinen statistisch signifikanten Unterschied zu dem Tonus vor Beginn der Versuchsdurchführung auf. ($M_{\text{prä}}=3,1 \pm 0,5$ mN, $M_{\text{post}}=2,7 \pm 0,6$ mN, $n=7$, $p=0,71$, t-Test für verbundene Stichproben). Ferner lässt sich auch nach zweimaliger Versuchsdurchführung im Durchschnitt kein Unterschied zwischen dem Tonus vor der ersten Substanzapplikation und dem endprozeduralen Tonus feststellen, auch wenn aufgrund der kleinen Stichprobengröße keine statistische Testung erfolgen konnte ($M_{\text{prä}}=3,1 \pm 0,5$ mN, $M_{\text{post}}=2,7 \pm 0,7$, $n=3$).

Während eines zweiten Versuchsdurchlaufes beträgt die durch Vasopressin ausgelöste Gefäßantwort $81,5 \pm 9,6\%$ der initialen Vasopressin-vermittelten Vasokonstriktion. Bezogen auf das jeweilige Vasopressin-Maximum kann in der zweiten Aliskiren-Versuchsreihe eine Reduktion des Gefäßtonus um $14,8 \pm 14,3\%$ unter der höchsten Aliskiren-Konzentration gegenüber $22,9 \pm 10,0\%$ während der initialen Durchführung registriert werden. Aufgrund der geringen Stichprobengröße ($n=3$) ist, wie bereits oben erwähnt, eine statistische Analyse nicht möglich, dennoch scheint es, ähnlich wie an der A. iliaca, nach einer Versuchsdurchführung zu einer Abnahme der Reagibilität und damit der Aliskiren-vermittelten Wirkung zu kommen.

3.2.2. Erhöhte extrazelluläre Kalium-Konzentration

Ebenfalls wurde an der Aorta abdominalis der Effekt von Aliskiren auf eine erhöhte extrazelluläre Kalium-Konzentration von 40 mmol/l - als elektrische Voraktivierung - untersucht.

Ebenfalls ähnlich den Kalium-Versuchsreihen an der A. iliaca, lässt sich auch für die Untersuchungen von Aliskiren unter Voraktivierung mit Kalium an der Aorta abdominalis keine signifikante Wirkung Aliskirens auf den Vasotonus darstellen (rmANOVA: $F_{(5,20)}=0,93$, $p=0,49$, $n=5$) (Aliskiren 1 $\mu\text{mol/l}$: $102,6 \pm 2,0\%$; Aliskiren 50 $\mu\text{mol/l}$: $104,4 \pm 3,8\%$) (Abb. 12).

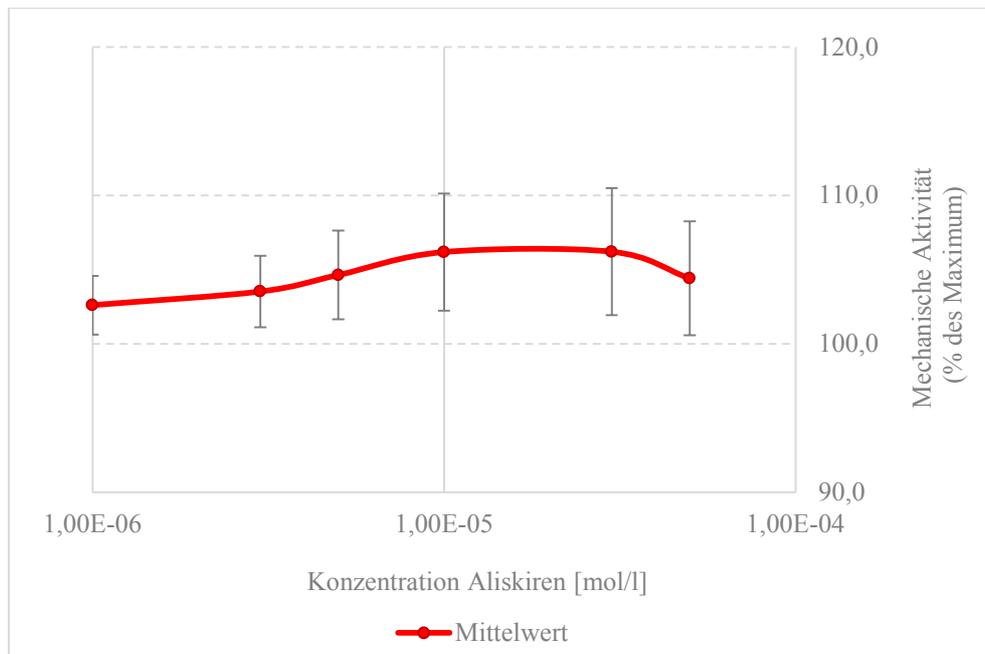


Abb. 12: Quantitative Analyse der Aliskiren-vermittelten Effekte an der Aorta

Alle Werte sind als Prozent der mechanischen Aktivität von Kalium 40mmol/l angegeben. Die Fehlerindikatoren zeigen den SEM an. Es lässt sich kein signifikanter Effekt unter aufsteigender Aliskiren-Dosierung erkennen (rmANOVA: $F_{(5,20)}=0,93$, $p=0,49$, $n=5$).

Da wir nach Kalium-Voraktivierung an der Aorta abdominalis keinen Effekt von Aliskiren aufzeigen konnten, wird auf die Analyse des endprozeduralen Tonus sowie der Reagibilität verzichtet.

3.3. DIE WIRKUNG VON ALISKIREN AUF DEN TONUS UND DIE SPONTANAKTIVITÄT DER PORTALVENE

3.3.1. Die Wirkung von Aliskiren unter Vasopressin-Voraktivierung

Die Vena porta unterscheidet sich von den bisher beschriebenen Präparaten der A. iliaca und der Aorta abdominalis durch seine zusätzlich zum basalen Gefäßtonus auftretende phasische

Spontanaktivität. Sodass die Wirkung von Aliskiren an der Portalvene nicht nur anhand der mechanischen Aktivität, sondern ferner auch über Amplitude, Frequenz und Dauer der spontanen Kontraktionen charakterisiert werden kann. Dementsprechend wurden auch nur die Präparate in die folgenden Analysen mit einbezogen, welche Spontanaktivität aufwiesen und damit als vollständig funktionsfähig zu charakterisieren waren (n=3).

Auch an der Portalvene wurde der Effekt von Aliskiren ebenfalls unter Voraktivierung mit Vasopressin 3 nmol/l untersucht.

Obleich schlussendlich lediglich drei Präparate die Einschlusskriterien erfüllten, lassen sich deutliche Wirkungen von Aliskiren unter Vasopressin-Voraktivierung an der Portalvene erkennen. Wie anhand Abbildung 13 beispielhaft für eine Messdurchführung dargestellt ist, führte eine Vasopressin-Voraktivierung zunächst zu einem Anstieg der mechanischen Aktivität des basalen Gefäßtonus, der Frequenz der Spontanaktivität sowie der Amplitude der Spontanaktivität und gleichzeitig zu einer Abnahme der Dauer einer Kontraktion. Dieser Effekt hielt nach Zugabe von 1 $\mu\text{mol/l}$ Aliskiren an. Möglicherweise handelt es sich dabei um eine Überlagerung des noch anhaltenden Vasopressin-Effekts. Ab 3 $\mu\text{mol/l}$ Aliskiren kam es dann jedoch zu einer Abnahme des basalen Gefäßtonus, der Frequenz der Spontanaktivität sowie der Amplitude der Spontanaktivität und gleichzeitiger Zunahme der Dauer einer spontanen Kontraktion. Interessanterweise, kehrte sich dieser Effekt mit steigender Aliskiren-Konzentration erneut um. So kann ab 30 $\mu\text{mol/l}$ eine erneute Zunahme der Frequenz und der Amplitude bei Abnahme der Dauer einer Kontraktion verzeichnet werden. Unter Vorbehalt der geringen Stichprobengröße ergibt sich damit für die Frequenz und Amplitude der Spontanaktivität ein U-förmiger und für die Dauer einer einzelnen Kontraktion ein umgekehrt U-förmiger Verlauf. Diese Beziehung wird noch einmal in Abbildung 14 portraitiert. Zusätzlich sind Tabelle 5 die Mittelwerte und Standardfehler zu entnehmen.

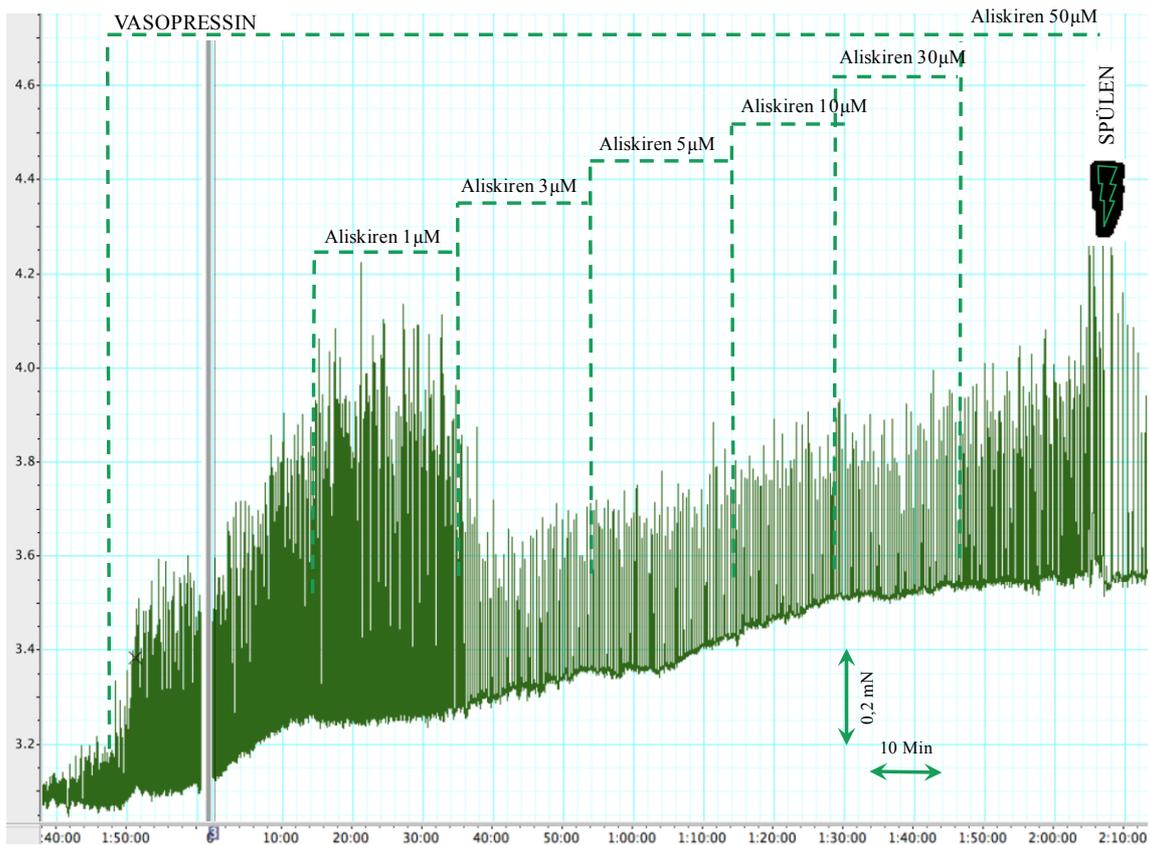


Abb. 13: Originalaufzeichnung einer Messdurchführung an der Portalvene

Das Gefäßpräparat zeigt auf die Aktivierung mit Vasopressin initial eine Zunahme des basalen Vasotonus, der Frequenz der Spontanaktivität sowie der Amplitude der Spontanaktivität, anschließend führt Aliskiren zu einer Abnahme der Frequenz der Spontanaktivität sowie der Amplitude der Spontanaktivität, um in hohen Konzentrationen zu einer erneuten Zunahme der Frequenz und der Amplitude zu führen. Die x-Achse bildet die Zeit [Min] ab, die y-Achse die mechanische Aktivität [mN].

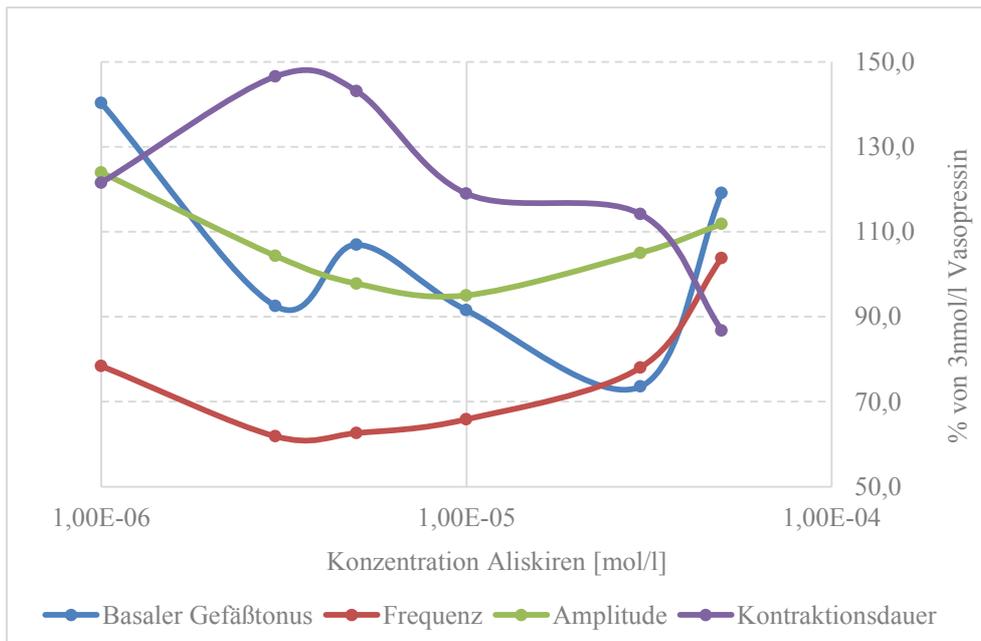


Abb. 14: Dosis-Wirkungsbeziehung der Aliskiren-vermittelten Wirkung auf die mechanische Aktivität des basalen Tonus sowie die Charakteristika der Spontanaktivität Frequenz, Amplitude und Dauer einer Kontraktion. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist auf die Darstellung von Fehlerindikatoren verzichtet worden. U-förmiger Verlauf für die Frequenz und Amplitude der Spontanaktivität und umgekehrt U-förmiger Verlauf für die Dauer einer einzelnen Kontraktion (n=3).

Aliskirendosierung [$\mu\text{mol/l}$]	Basaler Gefäßtonus [%] \pm SEM	Frequenz [%] \pm SEM	Amplitude [%] \pm SEM	Kontraktionsdauer [%] \pm SEM
1	140,28 \pm 17,23	78,39 \pm 12,96	123,96 \pm 22,64	121,55 \pm 0,86
3	92,51 \pm 4,08	61,86 \pm 7,65	104,32 \pm 30,65	146,55 \pm 12,07
5	106,95 \pm 10,06	62,62 \pm 8,63	97,80 \pm 29,27	143,10 \pm 5,17
10	91,53 \pm 9,68	65,86 \pm 11,65	95,04 \pm 29,50	118,97 \pm 5,17
30	73,59 \pm 11,43	78,07 \pm 15,36	105,04 \pm 24,11	114,14 \pm 3,10
50	119,13 \pm 21,85	103,82 \pm 13,72	111,83 \pm 9,10	86,78 \pm 10,92

Tab. 5: Dosisabhängige Aliskiren-Wirkung auf die Portalvene

Der endprozedurale Tonus unterscheidet sich nach einem vollständigen Versuchsdurchlauf nicht von dem Tonus vor Beginn der Versuchsdurchführung ($M_{\text{prä}}=3,0 \pm 0,2$ mN, $M_{\text{post}}=3,2 \pm 0,7$ mN, n=3). Jedoch nimmt einerseits die Frequenz der Spontanaktivität deutlich ab ($M_{\text{prä}}=0,08 \pm 0,01$ Hz, $M_{\text{post}}=0,03 \pm 0,00$ Hz), andererseits lässt sich eine Abnahme der Dauer einer Kontraktion verzeichnen ($M_{\text{prä}}=7,0 \pm 0,5$ s, $M_{\text{post}}=5,5 \pm 0,0$ s).

Eine zweite Versuchsdurchführung konnte in diesen Experimenten nicht erfolgen, da es nach einer Versuchsdurchführung zu einem fast vollständigen Ausbleiben der Spontanaktivität kam. Aus diesen Gründen muss auch auf die Auswertung der Reagibilität verzichtet werden.

3.3.2. Erhöhte extrazelluläre Kalium-Konzentration

Eine erhöhte extrazelluläre Kalium-Konzentration von 40mmol/l führte an der Portalvene der Ratte zu einer tonischen Vasokonstriktion. In den durchgeführten Experimenten kam es ferner nach Kaliumapplikation zu einem vollständigen Ausbleiben der Spontanaktivität, welche auch nach Ausspülen der Kaliumlösung nicht zurückkehrte. Aus diesen Gründen erfolgte zum einen keine zweite Versuchsdurchführung, zum anderen konnte in der Analyse und Beschreibung Wirkung nicht auf die Parameter der Spontanaktivität eingegangen werden.

Wie auch bereits an der A. iliaca und Aorta abdominalis, lässt sich insgesamt unter elektrischer Voraktivierung mit Kalium an der Portalvene keine Wirkung von Aliskiren beschreiben. Wie Abbildung 15 verdeutlicht kommt es nach der durch Kalium ausgelösten Vasokonstriktion zu keiner relevanten Veränderung des Vasotonus.

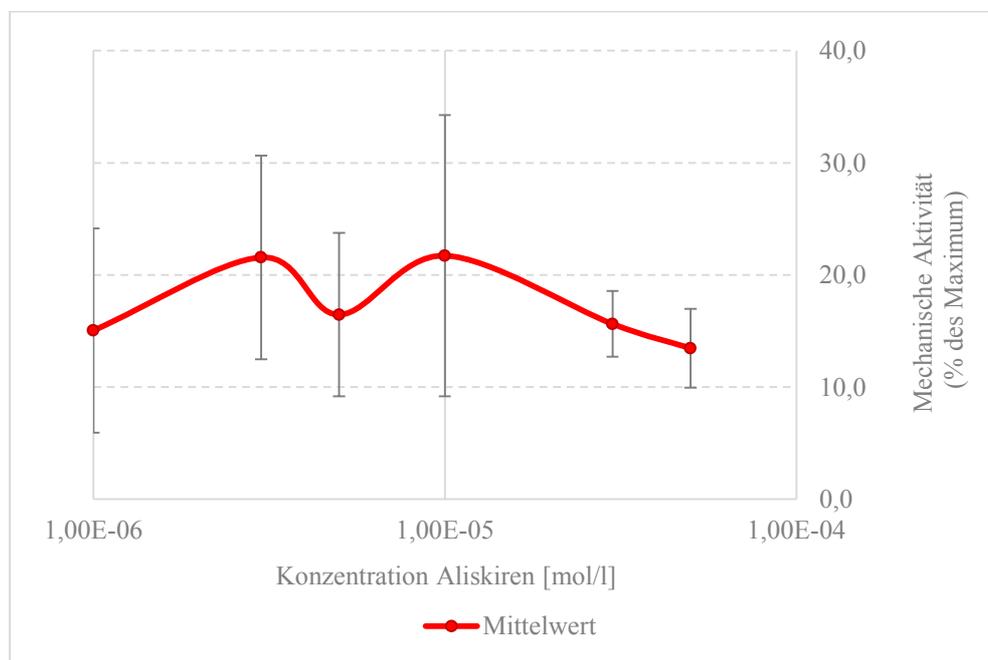


Abb. 15: Dosis-Wirkungsbeziehung der Aliskiren-vermittelten Effekte an der Portalvene unter Kalium-Voraktivierung

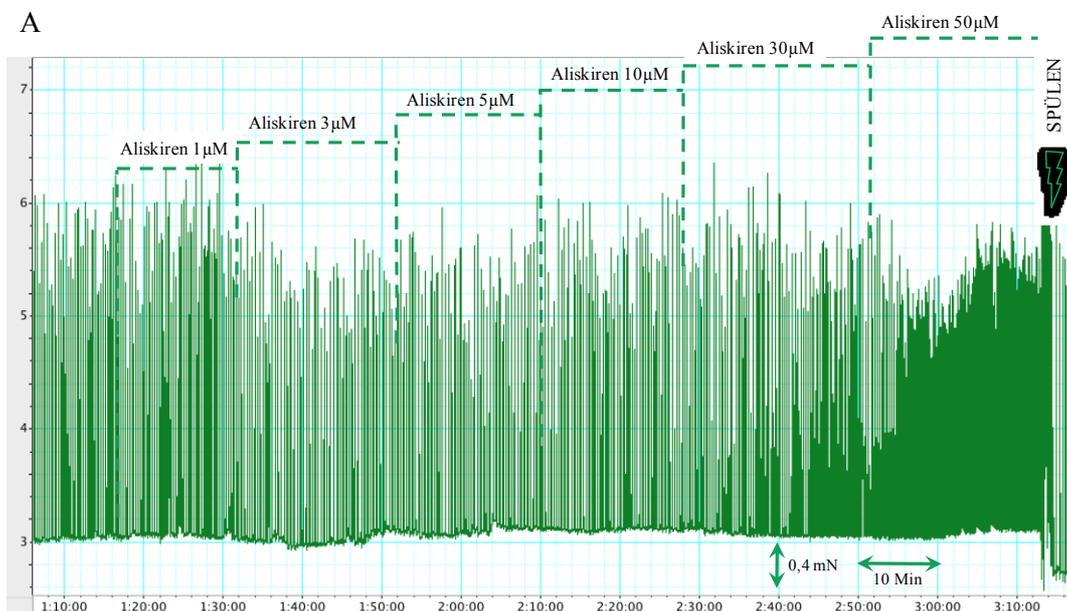
Alle Werte sind als Prozent der mechanischen Aktivität von Kalium 40 mmol/l angegeben. Die Fehlerindikatoren zeigen den SEM an. Es lässt sich kein Effekt unter aufsteigender Aliskiren-Dosierung erkennen (n=2).

Da unter Kalium-Voraktivierung an der Portalvene keine Wirkung von Aliskiren aufgedeckt werden konnte, wird auf die Analyse des endprozeduralen Tonus verzichtet.

3.3.3. Alleinige Aliskiren-Applikation

Nachdem wir unter Vasopressin-Voraktivierung vor allem eine Wirkung auf die Spontanaktivität der Portalvene aufzeigen konnten, erfolgte in einem weiteren Schritt die Untersuchung der Wirkung von Aliskiren ohne jegliche Voraktivierung. Wie bereits zuvor, erfolgte auch in diesem Fall zusätzlich zur Beschreibung der mechanischen Aktivität des basalen Gefäßtonus, die Analyse der Frequenz der Spontanaktivität sowie der Dauer und Amplitude einer einzelnen Kontraktion.

Dabei ist anhand der Abbildung (s. Abb. 16) einer exemplarischen Messaufzeichnung ersichtlich, dass es, wie bereits unter Vasopressin-Voraktivierung, ab $3 \mu\text{mol/l}$ Aliskiren zunächst zu einer Abnahme der Frequenz der Spontanaktivität sowie der Amplitude kam, sich dieser Effekt jedoch in höheren Dosierungen ab $30 \mu\text{mol/l}$ umkehrte und vor allem die Frequenz der Spontanaktivität wieder deutlich zunahm.



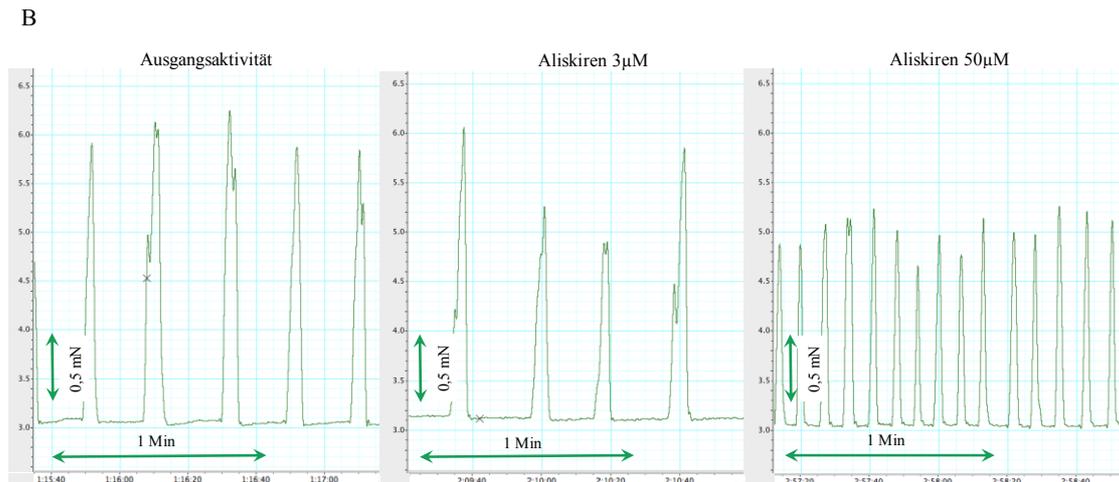


Abb. 16. Originalaufzeichnung einer Messdurchführung der Portalvene ohne jegliche Voraktivierung

A) Ab $3 \mu\text{mol/l}$ Aliskiren kommt es initial zu Abnahme der Frequenz der Spontanaktivität, welche sich ab einer Dosierung von $30 \mu\text{mol/l}$ Aliskiren umkehrt zu einer deutlichen Zunahme der Frequenz der Spontanaktivität.

B) vergrößerter Ausschnitt der Originalaufzeichnung zur besseren Veranschaulichung der Zunahme der Frequenz sowie der Abnahme der Amplitude einer Kontraktion. (x-Achse: Zeit [Min]; y-Achse: mechanische Aktivität [mN]).

Quantitativ (s. Abb. 17, 18) kam es zunächst unter Aliskiren zu einer Abnahme der Frequenz der Spontanaktivität - für die Dosierung von $3 \mu\text{mol/l}$ Aliskiren beträgt die Verminderung der Frequenz $26,5 \pm 5,3\%$ auf $73,5\%$ der Ausgangsfrequenz - während weiter aufsteigende Aliskiren-Dosierung wiederum zu einer Frequenzzunahme führten. Unter der höchsten verwendeten Aliskiren-Konzentration war ein Anstieg der Frequenz auf $220 \pm 45,5\%$ der Ausgangsaktivität zu verzeichnen. Trotz der geringen Stichprobengröße von zwei Beobachtungen lässt sich dabei ein homogener und eindeutiger Effekt wahrnehmen. Ähnlich stellt es sich auch für die weiteren Parameter der Spontanaktivität dar. Die Amplitude einer einzelnen Kontraktion nahm parallel zur Frequenz der Spontanaktivität erst ab und anschließend wieder zu. Entgegen den erst genannten beiden Parametern kam es zunächst zu einer Zunahme der Kontraktionsdauer und anschließend wiederum zu einer deutlichen Abnahme. Erneut wird, wie auch schon unter Vasopressin-Voraktivierung, deutlich, dass Aliskiren unter geringen Konzentrationen inhibitorische Eigenschaften auf die Spontanaktivität der Portalvene besitzt, in hohen Konzentrationen jedoch exzitatorische Funktionen besitzt. Auf den basalen Vasotonus der Portalvene ließ sich unter alleiniger Aliskiren-Applikation kein nennenswerter Effekt erkennen.

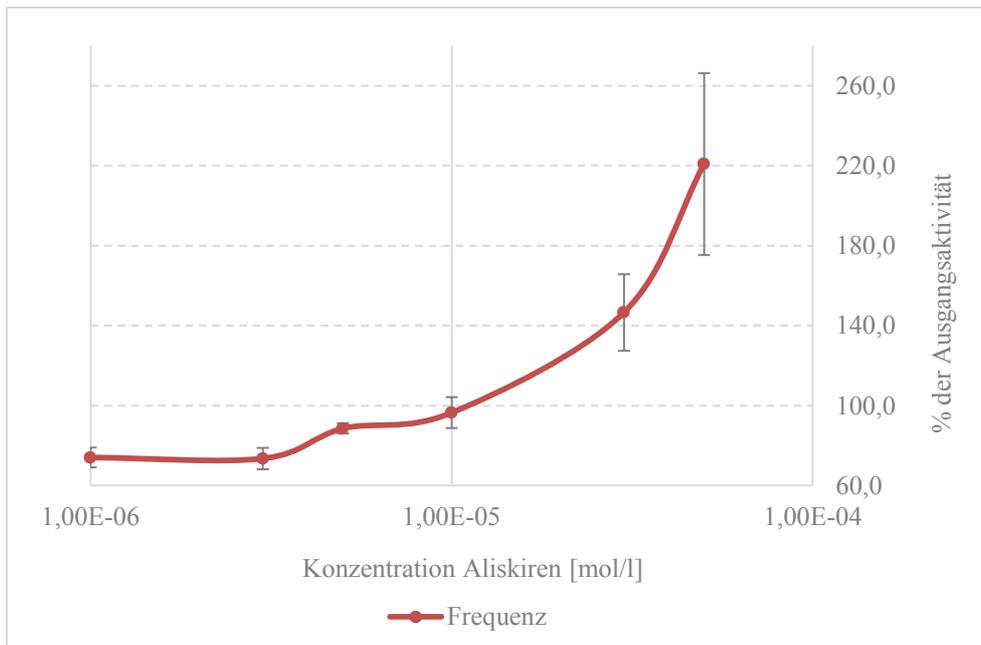


Abb. 17: Quantitative Analyse der Aliskiren-vermittelten Effekte bei alleiniger Applikation von Aliskiren an der Portalvene auf die Frequenz der Spontanaktivität

Alle Werte sind als Prozent der Ruheaktivität angegeben. Die Fehlerindikatoren zeigen den SEM an. Initial kommt es, wie hier ersichtlich, zu einer Abnahme der Frequenz und anschließend zu einer deutlichen Zunahme der Frequenz der Spontanaktivität (n=2).

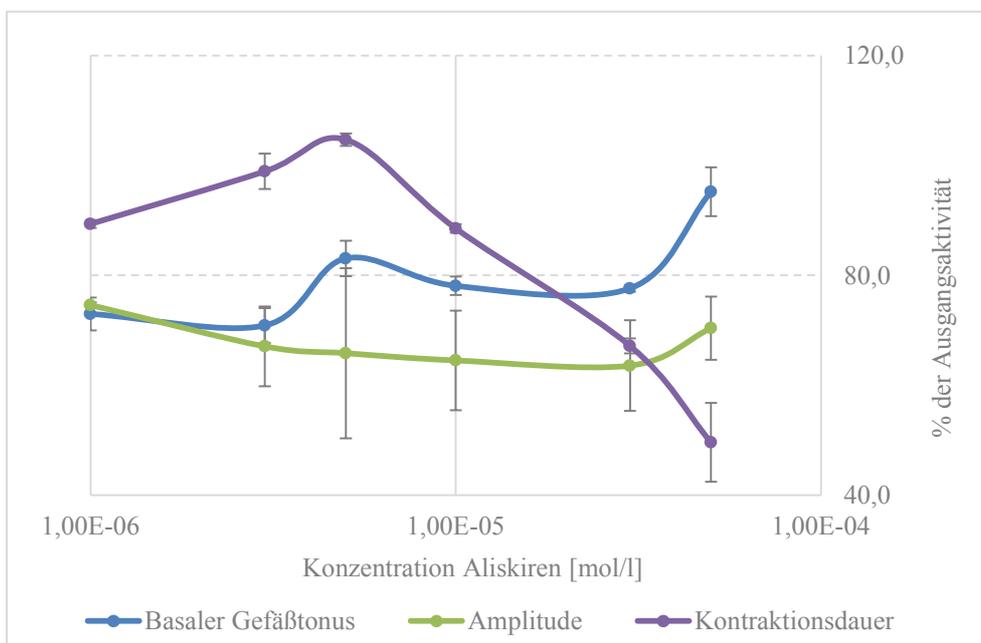


Abb. 18: Quantitative Analyse der Aliskiren-vermittelten Effekte bei alleiniger Applikation von Aliskiren an der Portalvene auf die mechanische Aktivität und Charakteristika der Spontanaktivität Amplitude und Dauer einer Kontraktion

Alle Werte sind als Prozent der Kontrolle angegeben. Die Fehlerindikatoren zeigen den SEM an (n=2).

3.3.4. Hypothese der Kalium-Kanal-vermittelten Wirkung

Vor dem Hintergrund der zuvor beschriebenen Wirkung Aliskirens auf die Spontanaktivität der Portalvene und der Tatsache, dass insbesondere Kalium-Kanäle an der Generierung der Spontanaktivität der Portalvene beteiligt sind, folgten in einem nächsten Schritt Untersuchungen verschiedener Kalium-Kanal-Antagonisten. Dabei war es das primär das Ziel Gemeinsamkeiten in der Wirkung auf die Spontanaktivität zwischen verschiedenen Kalium-Kanal-Antagonisten und Aliskiren zu identifizieren und auf diese Weise den funktionellen Mechanismus hinter der oben aufgezeigten Wirkung Aliskirens einzugrenzen.

Zu diesem Zweck wurden die entsprechenden Substanzen ähnlich dem Applikationsschema von Aliskiren in festen aufsteigenden Dosierungen eingesetzt und sowohl die Frequenz der Spontanaktivität als auch die Amplitude einer einzelnen Kontraktion ausgewertet. Abbildung 19 veranschaulicht dies beispielhaft für die Applikation von Glibenclamid. Ähnlich zu den Konzentrationen von Aliskiren lag auch hier zwischen jedem Konzentrationsschritt eine Zeit von durchschnittlich 15 Minuten.

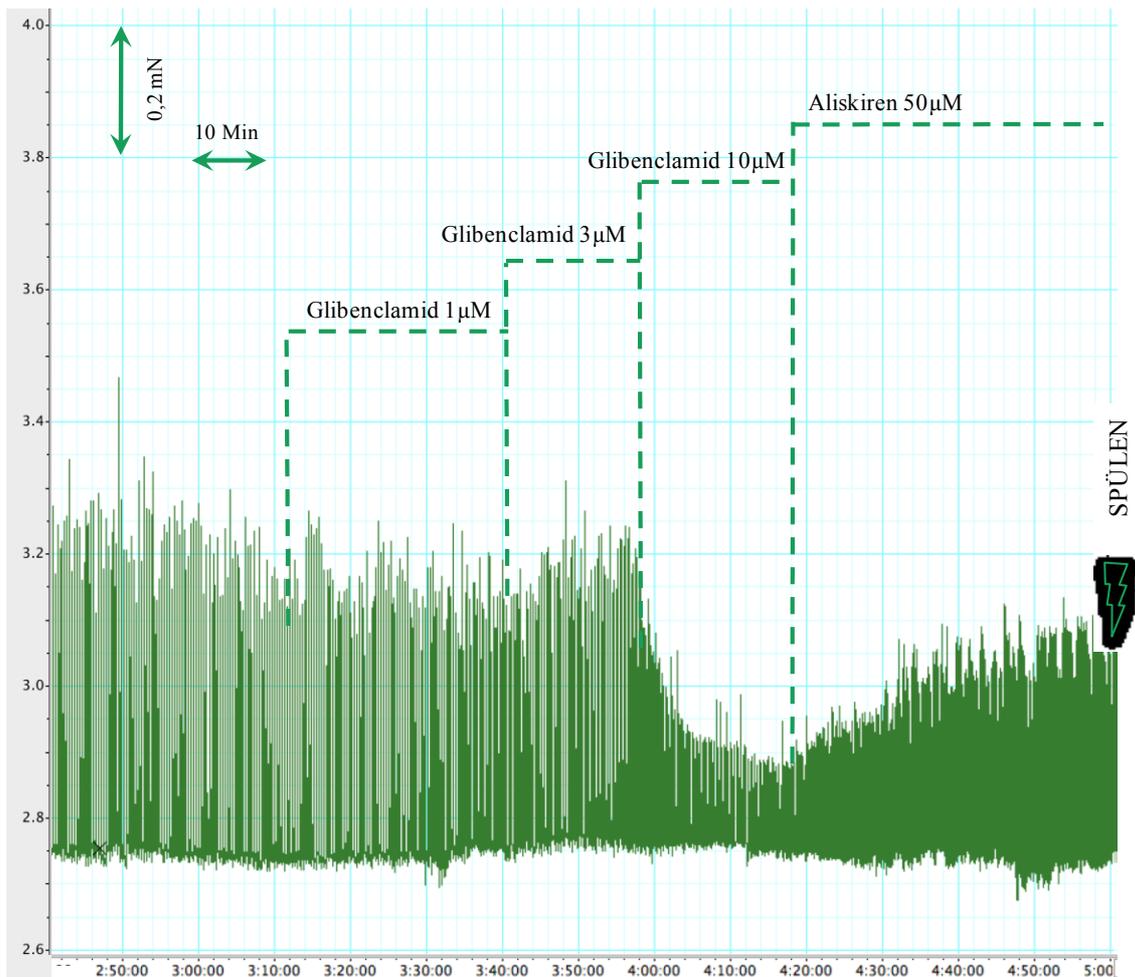


Abb. 19: Originalaufzeichnung einer Messdurchführung an der Portalvene mit Kalium-Kanal-Antagonisten
Exemplarische Darstellung für den K_{ATP} -Kanal-Antagonisten Glibenclamid in aufsteigender Dosierung

Tabelle 6 fasst die untersuchten Substanzen sowie die erhobenen Wirkungen auf Frequenz und Amplitude der Spontanaktivität zusammen. Die dazugehörigen quantitativen Daten der einzelnen Kalium-Kanal-Antagonisten sind Tabelle 1 des Anhangs detailliert zu entnehmen.

ALISKIREN		Apamin	Charybdotoxin	Dendrotoxin	Glibenclamid	TEA
	Kaliumkanal	SK-Kanäle	$I_{K(Ca)}$, $BK_{(Ca)}$ -Kanäle	K_V -Kanäle	K_{ATP} -Kanäle	in höheren Konz. unspez.
↑↑↑	Frequenz	↑↑	↓	↓↓	↑↑↑	↓↓↓
↓↓	Amplitude	↑	↑	↓↓↓	↓↓↓	↑↑↑

Tab. 6: Zusammenfassung der Kalium-Kanal-Antagonisten sowie ihrer Wirkung an der Portalvene

(↑ Effekt $\leq 10\%$; ↑↑ $10\% > \text{Effekt} \leq 30\%$, ↑↑↑ Effekt $> 30\%$; ↓ Effekt $\leq 10\%$; ↓↓ $10\% > \text{Effekt} \leq 30\%$, ↓↓↓ Effekt $> 30\%$)

Wie anhand von Tabelle 6 ersichtlich ähnelt vornehmlich die Wirkung von Glibenclamid als Antagonist des K_{ATP} -Kanals jener von Aliskiren. Dabei muss allerdings berücksichtigt werden, dass Glibenclamid bereits in Dosierungen von $1\mu\text{mol/l}$ hinreichend den K_{ATP} -Kanal blockiert und die verabreichten hohen Konzentrationen zu unspezifischen Effekten geführt haben können. Um einen eventuellen gemeinsamen Wirkmechanismus weiter zu beleuchten, bedienen wir uns in einem nächsten Schritt dem Kalium-20 mmol/l - Kalium-80 mmol/l - Test (Hamilton and Weir 1986; Piper et al. 1990; Edwards et al. 1991; Deitmer et al. 1992).

Dabei führt sowohl die extrazelluläre Kalium-Konzentration von 20 mmol/l als auch 80 mmol/l zu einer Depolarisation und damit zu einer Vasokonstriktion. Ein anschließend applizierter Kaliumkanalöffner – wir benutzen in diesem Falle Cromakalim in einer Dosierung von $1\mu\text{mol/l}$ – ruft im Falle einer extrazellulären Kalium-Konzentration von 20 mmol/l über die Öffnung von Kalium-Kanälen einen Efflux von Kalium aus der Zelle und damit eine Vasodilatation hervor. Jenes bleibt bei einer extrazellulären Kalium-Konzentration von 80 mmol/l jedoch aus. Ein reiner Kaliumkanalöffner sollte demnach bei einer extrazellulären Kalium-Konzentration von 80 mmol/l keinen weiteren Effekt verursachen. Ein Kalium-Kanal-Antagonist, wie beispielsweise Glibenclamid, verursacht bei einer extrazellulären Kalium-Konzentration von 20 mmol/l wiederum ein Schließen von Kalium-Kanäle, welches in Folge erneut zu einer Vasokonstriktion führt. Bei extrazellulärer Kalium-Konzentration von 80mmol/l sollte diese bei einem reinen Kalium-Kanal-Antagonisten wiederum ausbleiben.

Dementsprechend sollte sich Aliskiren, wenn es seine Wirkung über eine Form des Antagonismus am Kalium-Kanal vermittelt, sich ähnlich zu Glibenclamid im Kalium-20 mmol/l - Kalium-80mmol/l - Test verhalten.

Abbildung 20 zeigt die exemplarische Aufzeichnung einer Versuchsdurchführung des Kalium-20mmol/l - Kalium-80mmol/l - Test mit Aliskiren und Glibenclamid. Dabei kam es, wie erwartet, bei einer extrazellulären Kalium-Konzentration von 20 mmol/l durch Cromakalim zu einer signifikanten Vasodilatation um $79,8 \pm 15,4\%$ ($p=0,003$, FDR-korrigiert, t-Test für verbundene Stichproben, $n=5$). Nach Aliskiren ließ jedoch keine Veränderung des Vasotonus ($3,8 \pm 2,5\%$; $p=0,21$, FDR-korrigiert, t-Test für verbundene Stichproben, $n=5$) nachweisen, während Glibenclamid zu einer signifikanten Vasokonstriktion um $46,4 \pm 3,2\%$ in den durchgeführten Experimenten führte ($p<0,001$, FDR-korrigiert, t-Test für verbundene Stichproben, $n=5$).

Für eine extrazelluläre Kalium-Konzentration von 80mmol/l führte Cromakalim zu keiner wesentlichen Vasodilatation ($9,4 \pm 3,4\%$, $n=3$). Jedoch scheint es so, als ob Aliskiren eine zusätzliche Abnahme des Vasotonus von durchschnittlich $27,4 \pm 5,7\%$ ($n=3$) verursachte.

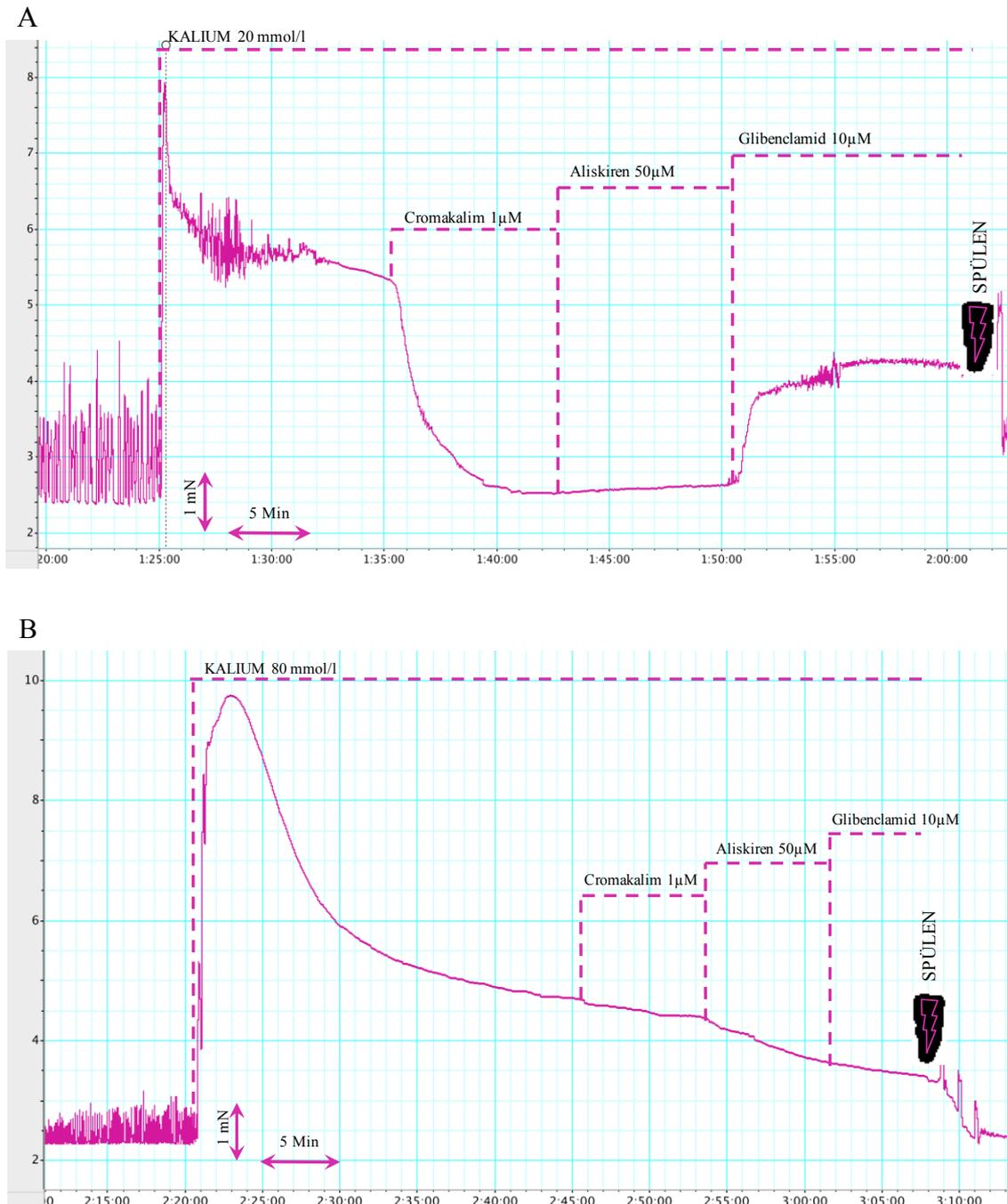


Abb. 20: Originalaufzeichnung einer Messdurchführung des Kalium-20mmol/l - Kalium-80mmol/l - Test an der Portalvene

Für eine extrazelluläre Kalium-Konzentration von A) 20mmol/l beziehungsweise B) 80mmol/l (x-Achse: Zeit [Min]; y-Achse: mechanische Aktivität [mN]).

3.4. DIE WIRKUNG VON ALISKIREN AM LANGENDORFF-HERZEN

3.4.1. Die Wirkung von Aliskiren unter Vasopressin-Voraktivierung

Der Versuchsaufbau der Langendorff-Apparatur erlaubt die Wirkung von Aliskiren über den Perfusionsdruck hinaus auch zusätzlich über Herzfrequenz und den linksventrikulären Druck (LVP) zu charakterisieren. In den initialen Experimenten mit Kalium- und Vasopressin-Voraktivierung erfolgte jedoch anfangs lediglich die Ableitung des Gefäßwiderstandes.

Da die Untersuchungen des Langendorff-Herzen mit Fortschreiten der Zeit methodisch bedingt in ihrer Qualität abnehmen und in Vorexperimenten für niedrige Konzentrationen von Aliskiren keinerlei Wirkung beobachtet werden konnte, wurde im Falle des Langendorff-Herzen der Effekt von Aliskiren 10 $\mu\text{mol/l}$ bis 50 $\mu\text{mol/l}$ (aufsteigendes Applikationsschema: Aliskiren 10 $\mu\text{mol/l}$ \rightarrow Aliskiren 30 $\mu\text{mol/l}$ \rightarrow Aliskiren 50 $\mu\text{mol/l}$) unter Voraktivierung mit Vasopressin 1 nmol/l untersucht.

Dabei kommt es initial zu einer steilen Zunahme des Vasotonus unter Vasopressin, welche nach einem Peak adaptiert, Aliskiren führte anschließend zu einer dosisabhängigen Vasokonstriktion (s. Abb. 21).

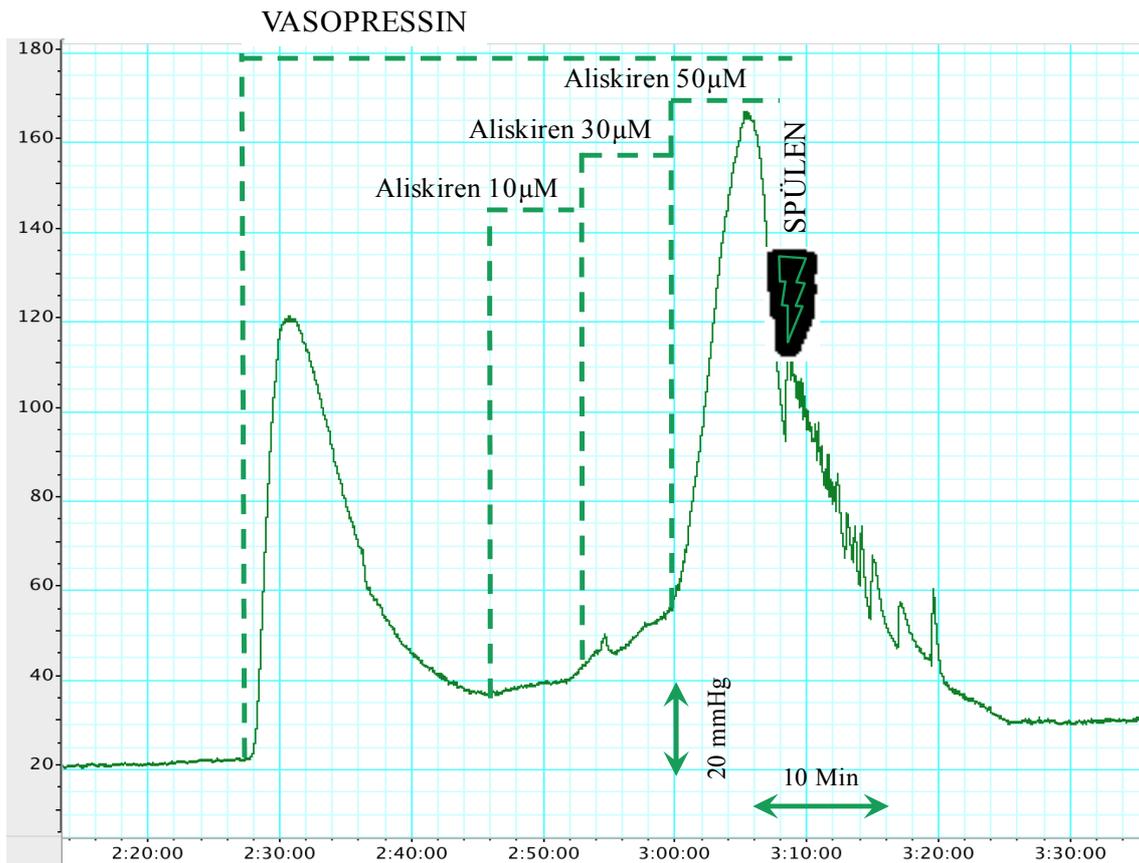


Abb. 21: Originalaufzeichnung des Perfusionsdruckes einer Messdurchführung am Langendorff-Herz
 Es kommt zu einer Vasopressin-induzierten Zunahme des Gefäßwiderstandes. Dosisabhängig führt Aliskiren zu einer signifikanten Widerstandserhöhung (x-Achse: Zeit [Min]; y-Achse: Perfusionsdruck [mmHg]).

Quantitativ zeigte sich unter der höchsten Aliskiren-Dosierung eine Zunahme des Vasotonus auf $108,7 \pm 12,0\%$ (n=4) (vgl. Abb. 22 und Tab. 7). Zwar erlaubte der Stichprobenumfang von vier Beobachtungen keine statistische Testung, dennoch sind die konstatierten Veränderungen eindeutig und über alle Versuche homogen.

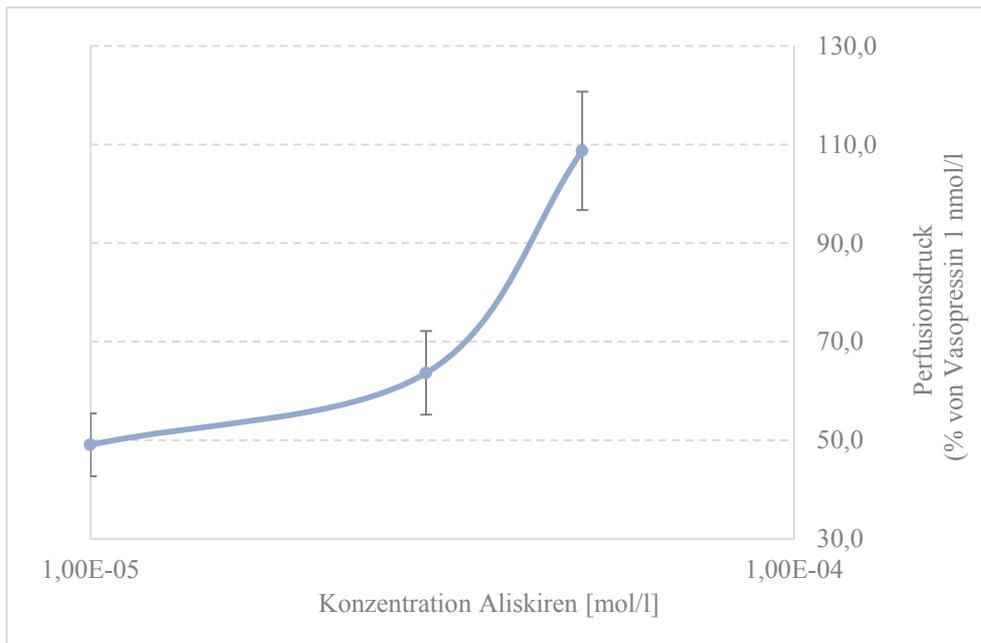


Abb. 22: Quantitative Analyse der Aliskiren-vermittelten Effekte am Langendorff-Herzen unter Vasopressin-Voraktivierung

Alle Werte sind als Prozent des Perfusionsdrucks von Vasopressin 1 nmol/l angegeben. Die Fehlerindikatoren zeigen den SEM an (n=4).

Aliskirendosierung [μmol/l]	Mittelwert (Perfusionsdruck [%])	Standardfehler (SEM)
10	49,04	6,37
30	63,64	8,49
50	108,72	12,03

Tab. 7: Dosisabhängige Aliskiren-Wirkung auf den Perfusionsdruck des Langendorff-Herzen unter Vasopressin-Voraktivierung

Wie in Abbildung 21 ersichtlich, lässt sich die Wirkung Aliskirens auf den Perfusionsdruck an der Langendorff-Apparatur nicht vollständig auswaschen. So unterscheidet sich der endprozedurale Druck nach einem vollständigen Versuchsdurchlauf von dem Druck vor Beginn der Versuchsdurchführung ($P_{\text{prä}}=29,2 \pm 4,6$ mmHg, $P_{\text{post}}=40,6 \pm 7,9$ mmHg, n=4).

3.4.2. Die Wirkung von Aliskiren unter Kalium-Voraktivierung

Auch unter erhöhter extrazellulärer Kalium-Konzentration von 20 mmol/l führte Aliskiren zu einer dosisabhängigen Erhöhung des Perfusionsdruckes und damit einhergehend einer Zunahme des Gefäßwiderstandes. Dabei konnten wir für den Innersubjektfaktor ALISKIREN-DOSIERUNG einen signifikanten Haupteffekt ($F_{(2,8)}=14,26$, $p=0,002$) finden, was bedeutet, dass es unter Zugabe von Aliskiren zu einer signifikanten Vasokonstriktion nach Kalium-Voraktivierung kommt. Post-hoc Analysen zeigten, dass sich ab einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ eine statistisch signifikante Tonuszunahme auf $113,3 \pm 3,6\%$ ($p=0,03$, FDR-korrigiert, $n=5$) verzeichnen lässt. Unter der höchsten verwendeten Aliskiren-Konzentration von 50 $\mu\text{mol/l}$ kam es zu einer Zunahme des Perfusionsdrucks auf $283,5 \pm 32,8\%$ ($p=0,027$, FDR-korrigiert, $n=5$) (s. Abb. 23). Die Werte der übrigen Dosierungen inklusive Signifikanzniveau sind in der Tabelle 8 dargestellt.

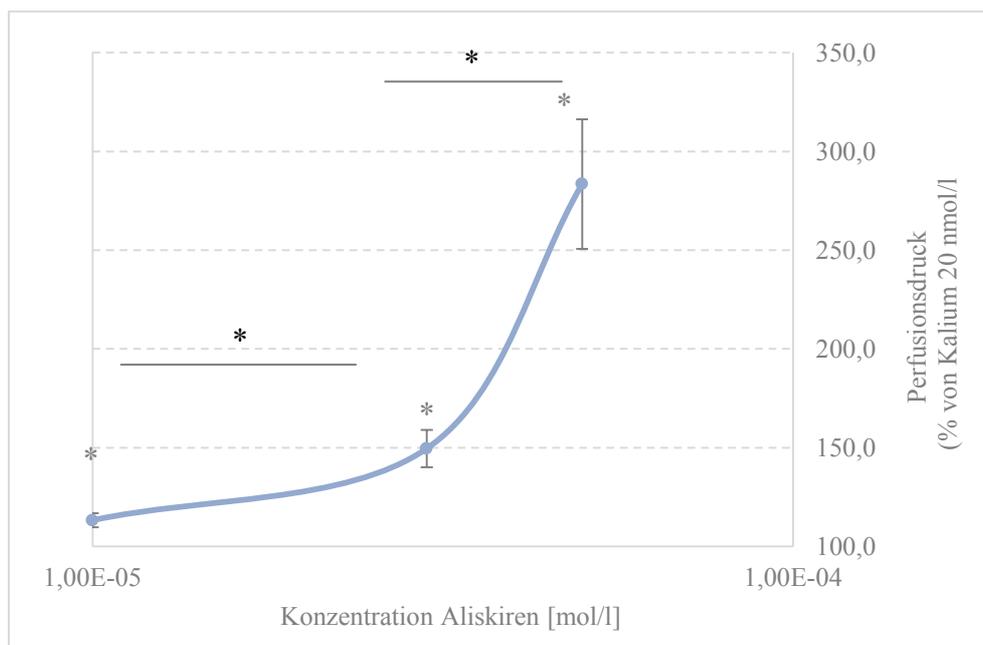


Abb. 23: Quantitative Analyse des Aliskiren-vermittelten Effekts am Langendorff-Herzen unter Voraktivierung mit Kalium 20 mmol/l

Alle Werte sind als Prozent des Perfusionsdrucks von 20mmol/l Kalium angegeben. Die Fehlerindikatoren zeigen den SEM an. * $p<0,05$ (t-Test für abhängige Stichproben der jeweiligen Dosierung im Vergleich 20 mmol/l Kalium, beziehungsweise zweiseitiger t-Test für verbundene Stichproben), $n=5$.

Aliskirendosierung [μmol/l]	Mittelwert (Perfusionsdruck [%])	Standardfehler (SEM)	Signifikanzniveau (p)	Signifikanzniveau, FDR-korrigiert
10	113,27	3,58	0,03	0,03
30	149,59	9,49	0,01	0,02
50	283,48	32,78	0,01	0,02

Tab. 8: Dosisabhängige Aliskiren-Wirkung auf den Perfusionsdruck des Langendorff-Herzen unter Kalium-Voraktivierung

Der endprozedurale Tonus nach einer Versuchsdurchführung unter Voraktivierung mit kaliumreicher Lösung tendierte dazu gegenüber der Ausgangslage mit $28,5 \pm 2,6$ mmHg auf $41,5 \pm 7,6$ mmHg anzusteigen ($p=0,09$, $n=5$).

3.4.3. Alleinige Aliskiren-Applikation

Nachdem es sowohl unter Voraktivierung mit Kalium als auch Vasopressin ein Effekt durch Aliskiren zu einer Zunahme des Perfusionsdruckes kam, erfolgte die Untersuchung des Aliskiren-Effekts anschließend auch ohne Voraktivierung. Wie obenstehend, soll hierbei neben dem Koronarwiderstand auch der linksventrikuläre Druck sowie die Herzfrequenz beschrieben werden (s. Abb. 24).

In einer zweifaktoriellen rm-ANOVA ließen sich sowohl ein signifikanter Haupteffekt für die Innersubjektfaktoren ALISKIREN-DOSIERUNG ($F_{(2,14)}=12,17$, $p=0,001$) und PARAMETER ($F_{(2,14)}=6,04$, $p=0,01$) als auch ein signifikanter Interaktionseffekt von ALISKIREN-DOSIERUNG x PARAMETER ($F_{(4,28)}=11,32$, $p<0,001$) nachweisen. Jene Ergebnisse deuten darauf hin, dass, abhängig vom betrachteten Parameter, es zu unterschiedlichen konzentrationsabhängigen Effekten Aliskirens kommt. Dabei veranschaulicht Abbildung 25 diesen Zusammenhang.

Wie bereits unter Vasopressin- als auch Kalium-Voraktivierung führte auch die alleinige Applikation von Aliskiren zu einer deutlichen Zunahme des Perfusionsdrucks unter allen verwendeten Konzentrationen. Unter einer Aliskiren-Konzentration von $30 \mu\text{mol/l}$ lässt sich eine signifikante Zunahme des Koronarwiderstandes auf $124,5 \pm 4,5$ % des Basisdrucks verzeichnen ($p<0,001$, FDR-korrigiert, $n=19$). Unter maximaler Aliskiren-Konzentration von $50 \mu\text{mol/l}$ kommt es zu einem signifikanten Anstieg des Koronarwiderstandes auf $194,0 \pm 13,0$ % des Ausgangstonus ($p<0,001$, FDR-korrigiert, $n=19$) (s. Abb. 25).

Darüber hinaus kann unter maximal verwendeter Aliskiren-Konzentration von $50 \mu\text{mol/l}$ eine Abnahme der Herzfrequenz auf $70,8 \pm 4,1$ % der Basisfrequenz ($p<0,001$, FDR-korrigiert,

n=9) sowie eine Zunahme der Kontraktionskraft auf $156,0 \pm 23,7\%$ des Ausgangswertes ($p=0,05$, $n=9$) beschrieben werden (s. Abb. 25). Die weiteren quantitativen Daten sind Tabelle 2 des Anhangs zu entnehmen.

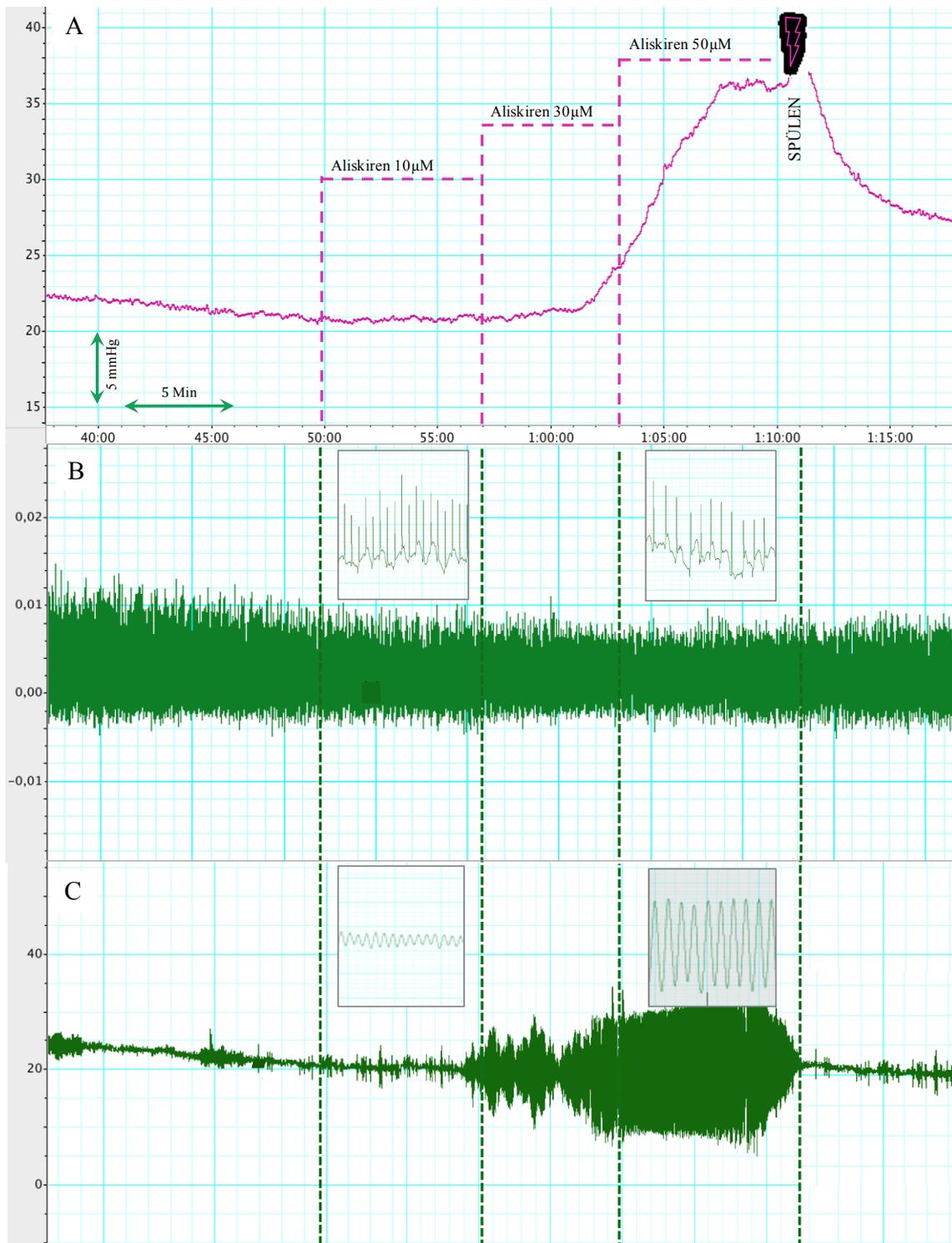


Abb. 24: Originalaufzeichnung einer Messdurchführung an der Langendorff-Apparatur

A) Perfusionsdruck/Koronarwiderstand: Es kam zu einer dosisabhängigen Zunahme des Perfusionsdruckes unter Aliskiren, (x-Achse: Zeit [Min], y-Achse: Perfusionsdruck [mmHg]).

B) EKG/Herzfrequenz: Unter steigender Konzentration führte Aliskiren, wie auf den vergrößerten Ausschnitten ersichtlich, zu einer Abnahme der Frequenz, (x-Achse: Zeit [Min], y-Achse: Amplitude [V]).

C) Linksventrikulärer Druck: Es zeigt sich eine Zunahme des linksventrikulären Drucks unter Aliskiren-Applikation, (x-Achse: Zeit [Min], y-Achse: LVP [mmHg]).

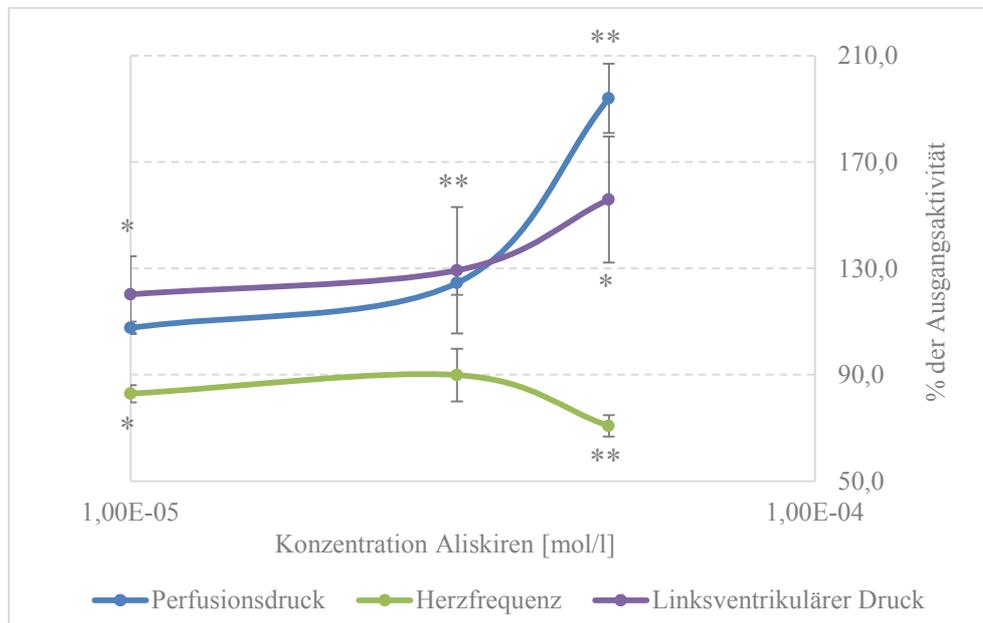


Abb. 25: Quantitative Analyse der Aliskiren-vermittelten Effekte bei alleiniger Applikation von Aliskiren am Langendorff-Herz auf den Perfusionsdruck sowie die Frequenz und Kontraktionskraft

Alle Werte sind als Prozent der Ruhebedingung angegeben. Für eine alle zum Einsatz gekommenen Dosierung lässt sich eine statistisch signifikante Zunahme des Perfusionsdruckes nachweisen. Für die Kontraktionskraft zeigt sich für 50 $\mu\text{mol/l}$ eine signifikante Zunahme der Kontraktionskraft. Ferner kommt es zu einer signifikanten Abnahme der Herzfrequenz unter 50 $\mu\text{mol/l}$ Aliskiren, Die Fehlerindikatoren zeigen den SEM an. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (t-Test für abhängige Stichproben der jeweiligen Dosierung im Vergleich zur Ausgangsaktivität; $n=9$ (Herzfrequenz und Linksventrikulärer Druck) bzw. $n=19$ (Perfusionsdruck)).

Der endprozedurale Tonus nach einer Versuchsdurchführung unter alleiniger Aliskirenapplikation ist mit $40,2 \pm 23,3$ mmHg gegenüber dem Ausgangswert von $30,3 \pm 19,5$ mmHg erhöht ($p < 0,001$, $n=19$).

Aufgrund der Beobachtung, dass es unter allen zuvor beschriebenen Bedingungen nach Aliskiren-Applikation zu einer Zunahme des endprozeduralen Tonus gekommen ist, erfolgte eine weitere Differenzierung, ob es sich hierbei um ein methodisches Phänomen oder einen Aliskiren-Effekt handelt. Denkbar wäre beispielsweise, dass es über die Untersuchungszeit zu einem Zuschwellen der Koronararterien oder zu Mikroembolien kommt. Dazu erfassten wir über einen Zeitraum von vier Stunden zu jeder vollen Stunde (t_0 =Start; t_1 =1.Stunde; t_2 =2.Stunde; t_3 =3.Stunde; t_4 =4.Stunde) den Perfusionsdruck unter Applikation von 50 $\mu\text{mol/l}$ Aliskiren ($n=7$) beziehungsweise unter elektrischer Aktivierung von 40 mmol/l Kalium ($n=2$).

Als Kontrollbedingung wurde der Perfusionsdruck zum selben Zeitpunkt unter Ruhebedingungen, das heißt ohne jegliche Aktivierung gemessen (n=6).

Dabei fand sich in einer rm-ANOVA ein signifikanter Haupteffekt für den Innersubjektfaktor ZEIT ($F_{(3,33)}=13,95$, $p<0,001$), sowie ein signifikanter Haupteffekt für den Zwischensubjekt APPLIKATION ($F_{(1,11)}=7,61$, $p=0,02$). Dieses Ergebnis legt nahe, dass es sowohl über die beobachtete Zeit hinweg zu einer signifikanten Veränderung des Perfusionsdruckes als auch zu signifikant unterschiedlichen Veränderungen zwischen denen Form der Aktivierung gekommen ist. Einschränkend muss konstatiert werden, dass in die ANOVA nur die Kontrollbedingung sowie die Aliskiren-Aktivierung einfließen konnten, da der Stichprobenumfang der elektrischen Aktivierung mittels Kalium nicht ausreichend groß gewesen ist. Post-hoc Analysen zeigten, dass es ab t2 über beide Bedingungen hinweg zu einem signifikanten Anstieg des Perfusionsdruckes gegenüber dem Ausgangswert kam ($133,5 \pm 12,5\%$, $p=0,04$, FDR-korrigiert, n=13). Der Perfusionsdruck stieg über die weitere Beobachtungszeit weiterhin an, und so konnte für beide Bedingungen, also die Aliskiren-Bedingung sowie die Kontrollbedingung, nach drei und vier Stunden weiterhin ein erhöhter Perfusionsdruck (t3: $158,3 \pm 12,9\%$, $p=0,003$; t4: $205,9 \pm 21,4\%$, $p<0,001$, FDR-korrigiert, n=13) gefunden werden. Für die Aktivierung mit Kalium lässt sich ebenfalls ein stetiger Anstieg des Perfusionsdruckes über die Zeit beschreiben.

Das lässt den Schluss zu, dass eine Zunahme des endprozeduralen Druckes nach vier Stunden zumindest teilweise einem methodischen Phänomen der Apparatur des Langendorff-Herzen geschuldet ist und eine Zunahme des Perfusionsdruckes und damit einhergehend des Koronarwiderstandes in gewisser Form ein Zuschwellen der Koronararterien reflektiert.

Zu erwähnen ist jedoch auch, dass der Vergleich zwischen der Aliskiren- und Kontrollbedingung einen signifikanten Unterschied für t1, t2, und t3 erbrachte (t1: $p=0,04$; t2: $p=0,04$; t3: $p=0,008$) (s. Abb. 26).

Zusammenfassend scheint es daher so, dass zum Endpunkt der Messung (t4) der Perfusionsdruck zwischen den einzelnen Bedingungen der Voraktivierung nicht unterschiedlich ist und in diesem Fall am ehesten ein implizites Phänomen der Methodik wie beispielsweise ein Zuschwellen der Koronararterien zum Tragen kommt, unter Voraktivierung mit Aliskiren dieser Prozess jedoch eventuell früher auftritt beziehungsweise zusätzlich Phänomene eine Rolle spielen. In diesem Zusammenhang muss auch an eventuell mögliche Mikroembolien im Rahmen von Pharmakonrückständen gedacht werden, welche trotz gewissenhaftem Lösen sowie Filtrieren aufgetreten sein mögen.

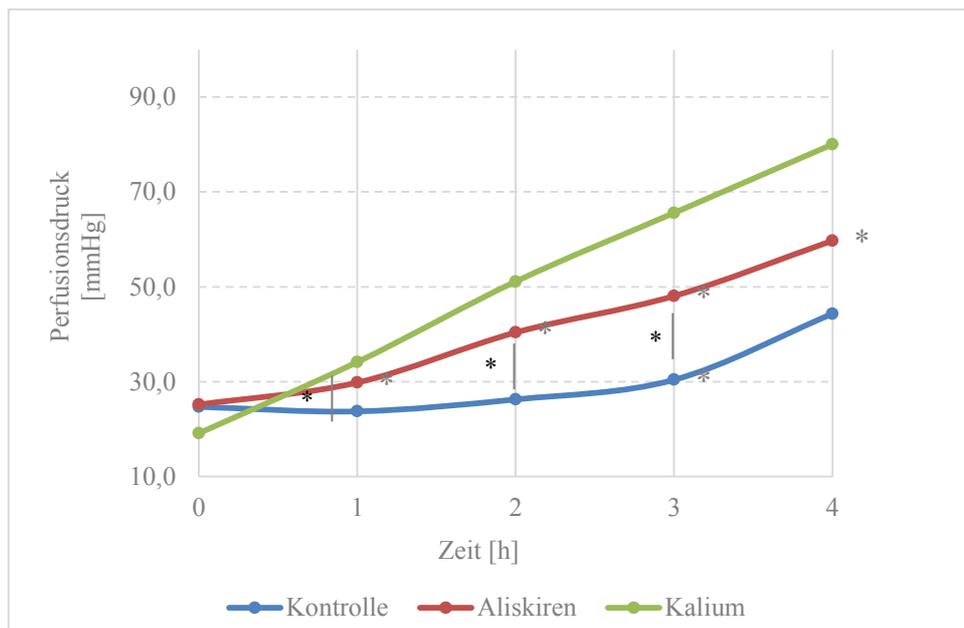


Abb. 26: Vergleich des Perfusionsdruckes unter Voraktivierung mit Aliskiren (n=7) beziehungsweise Kalium (n=2) im Vergleich zur Kontrollbedingung ohne Voraktivierung (n=6) zu den obenstehenden Zeitpunkten. Zur Erhaltung der Übersichtlichkeit ist auf die Darstellung von Fehlerindikatoren verzichtet worden, * $p < 0,05$ (t-Test für verbundene Stichproben im Vergleich zum Zeitpunkt t_0 , beziehungsweise zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben).

3.4.4. Hypothese der RAAS-vermittelten Wirkung

Für eine weitere Analyse des Mechanismus der Wirkungen, welche bislang für Aliskiren beschrieben wurden, erfolgten weiterführende Untersuchungen unter der Hypothese einer Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems-vermittelten Wirkung Aliskiren. Dabei sollte durch zusätzliche Blockade des RAA-Systems mittels des AT_1 -Antagonisten Losartan ein RAAS-vermittelter Effekt Aliskirens ausgeschlossen werden. Dementsprechend wurde primär Losartan in einer Dosierung von $10 \mu\text{mol/l}$ und anschließend das bekannte aufsteigende Aliskiren-Konzentrationschema appliziert.

Für jene Versuchsdurchführung standen nur die Auswertungen des Perfusionsdruckes zur Verfügung.

Der Vergleich zwischen zusätzlicher RAAS-Blockade mit Losartan (n=6) und alleiniger Aliskiren-Applikation (n=19) bestätigte erneut eine dosisabhängige Wirkung Aliskirens auf den Perfusionsdruck (rm-ANOVA: Haupteffekt der Innersubjektfaktoren ALISKIREN-DOSIERUNG: $F_{(2,38)}=20,10$, $p < 0,001$), ließ jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen

zusätzlicher RAAS-Blockade mit Losartan und alleiniger Aliskiren-Applikation erkennen (Interaktionseffekt ALISKIREN-DOSIERUNG x LOSARTAN: $F_{(2,38)}=0,16$, $p=0,85$; Haupteffekt der Zwischensubjektfaktoren LOSARTAN: $F_{(1,19)}=0,44$, $p=0,52$) (s. Abb. 27).

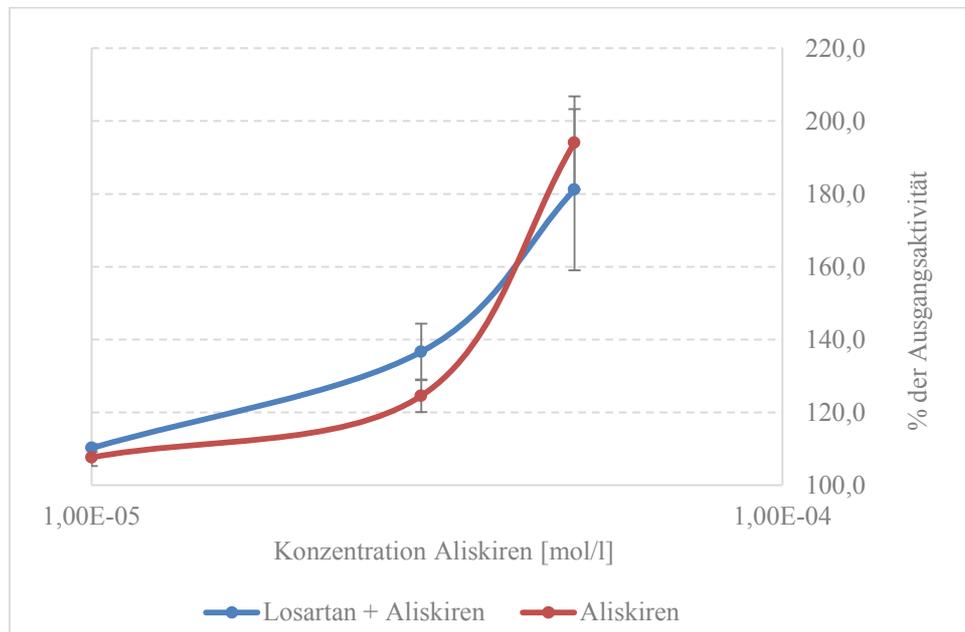


Abb. 27: Vergleich der Dosis-Wirkungsbeziehungen der Zunahme des Perfusionsdruckes unter alleiniger aufsteigender Aliskiren-Applikation (n=19) im Vergleich zu aufsteigenden Aliskiren-Konzentrationen unter zusätzlicher RAAS-Blockade über Losartan 10 $\mu\text{mol/l}$ (n=6).

Alle Werte sind als Prozent der Ruhebedingung angegeben. Es konnte sich keinerlei Unterschied zwischen beiden Bedingungen finden lassen (Interaktionseffekt ALISKIREN-DOSIERUNG x LOSARTAN: $F_{(2,38)}=0,16$, $p=0,85$; Haupteffekt der Zwischensubjektfaktoren LOSARTAN: $F_{(1,19)}=0,44$, $p=0,52$) Die Fehlerindikatoren zeigen den SEM an.

3.4.5. Hypothese der Beta-Adrenozeptor-vermittelten Wirkung

Da wir in der Langendorff-Apparatur eine Aliskiren-vermittelte Frequenzabnahme bei gleichzeitiger Zunahme der Kontraktionskraft beobachten konnten - ein Effekt, welcher ebenfalls gut bekannt von Beta-Adrenozeptor-Antagonisten ist, erfolgten in einem weiteren Schritt Untersuchungen zu einer möglichen Beta-Adrenozeptor-vermittelten Wirkung Aliskirens. Sollte dementsprechend Aliskiren seine Wirkung über Beta-Rezeptoren vermitteln, dürfte bei vorheriger und zusätzlicher Blockade des entsprechenden Beta-Adrenozeptors ein schwächerer beziehungsweise kein weiterer Aliskiren-vermittelter Effekt mehr zu beobachten sein.

Alle Untersuchungen erfolgten dabei unter vorheriger Aktivierung mit 1 $\mu\text{mol/l}$ Noradrenalin. Als Beta-Adrenozeptor-Antagonisten wurden Propranolol (n=5), als nicht-selektiver β -Adrenozeptor-Antagonist, Bisoprolol (n=6), als selektiver β_1 -Adrenozeptor-Antagonist, und ICI 118551 (n=6), als selektiver β_2 -Adrenozeptor-Antagonist, sowie die kombinierte Applikation aus Bisoprolol und ICI 118551 (n=6) gewählt. Diese wurden jeweils in einer Dosierung von 10 $\mu\text{mol/l}$ vor Aliskiren in einer Dosierung von 50 $\mu\text{mol/l}$ appliziert.

Für den Parameter des Perfusionsdrucks ließ sich ein signifikanter Haupteffekt für den Zwischensubjektfaktor BETA-ADRENOZEPTOR-ANTAGONIST finden ($F_{(4,37)}=3,55$, $p=0,015$). Anhand der post-hoc-Analysen konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der Wirkung der alleinigen Aliskiren-Applikation (n=19) und jener von Aliskiren unter zusätzlicher ICI 118551-Applikation (n=6) dargestellt werden ($p=0,032$; FDR-korrigiert). Es zeigte sich eine signifikant geringere Zunahme des Perfusionsdruckes nach Aliskiren-Applikation unter zusätzlicher β_2 -Blockade auf $132,5 \pm 3,9\%$ gegenüber $194,0 \pm 13,0$ (s. Abb. 28). Auch wenn die übrigen Beta-Antagonisten ebenfalls zu einer geringeren Zunahme des Perfusionsdrucks nach Aliskiren zu führen scheinen, ließ sich dieses statistisch nicht verifizieren (alle p-Werte $>0,2$).

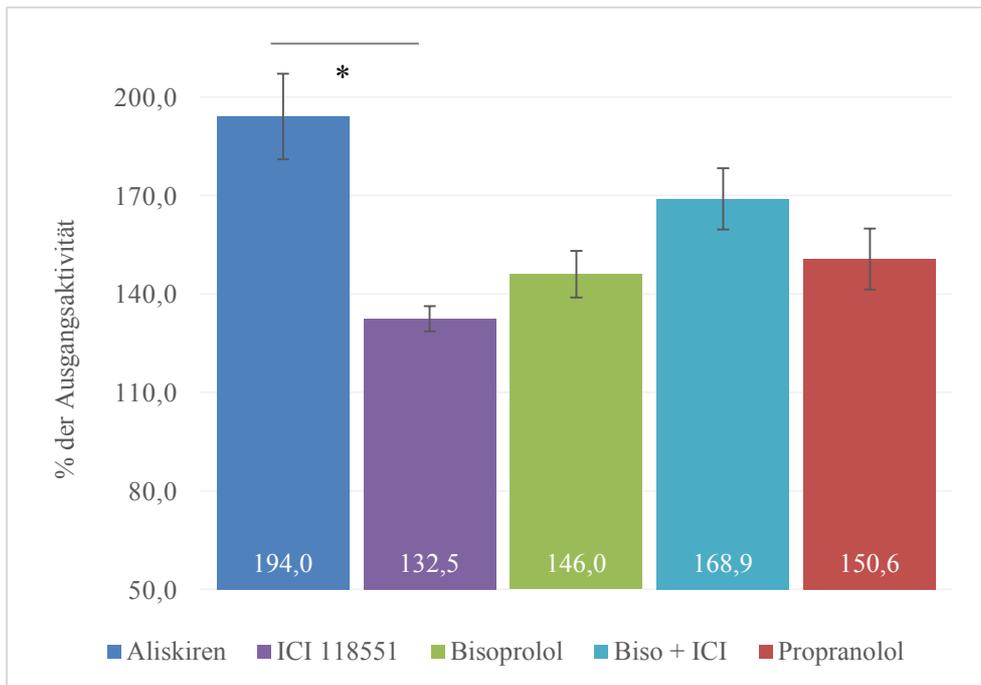


Abb. 28: Quantitative Analyse der Zunahme des Perfusionsdruckes unter alleiniger Aliskiren-Applikation (n=19) im Vergleich zu zusätzlicher β -Blockade mittels ICI 118551 (n=6), Bisoprolol (n=6), der Kombination beider (n=6) sowie Propranolol (n=5),

Alle Werte sind als Prozent der Ruhebedingung angegeben. Für ICI 118551 konnte eine signifikante geringere Zunahme des Perfusionsdruckes unter Aliskiren-Zugabe nachgewiesen werden. Die Fehlerindikatoren zeigen den SEM an. * $p < 0.05$ (zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben, FDR-korrigiert).

Bezüglich der Herzfrequenz zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Haupteffekt für den Zwischensubjektfaktor BETA-ADRENOZEPTOR-ANTAGONIST $F_{(4,27)}=7,00$, $p=0,001$). Post-hoc-t-Test erbrachten erneut einen signifikanten Unterschied zwischen der Wirkung der alleinigen Aliskiren-Applikation (n=9) und jener von Aliskiren unter zusätzlicher ICI 118551-Applikation (n=6) ($p=0,036$; FDR-korrigiert). Unter zusätzlicher β_2 -Blockade kam es zu einer signifikant geringeren Abnahme Herzfrequenz gegenüber der alleinigen Aliskiren-Wirkung (Aliskiren: $70,8 \pm 4,9\%$ ICI + Aliskiren: $110,5 \pm 10,0$) (s. Abb-27). Für die weiteren Beta-Antagonisten fanden sich keine statistisch signifikanten Änderungen (alle p-Werte $> 0,2$).

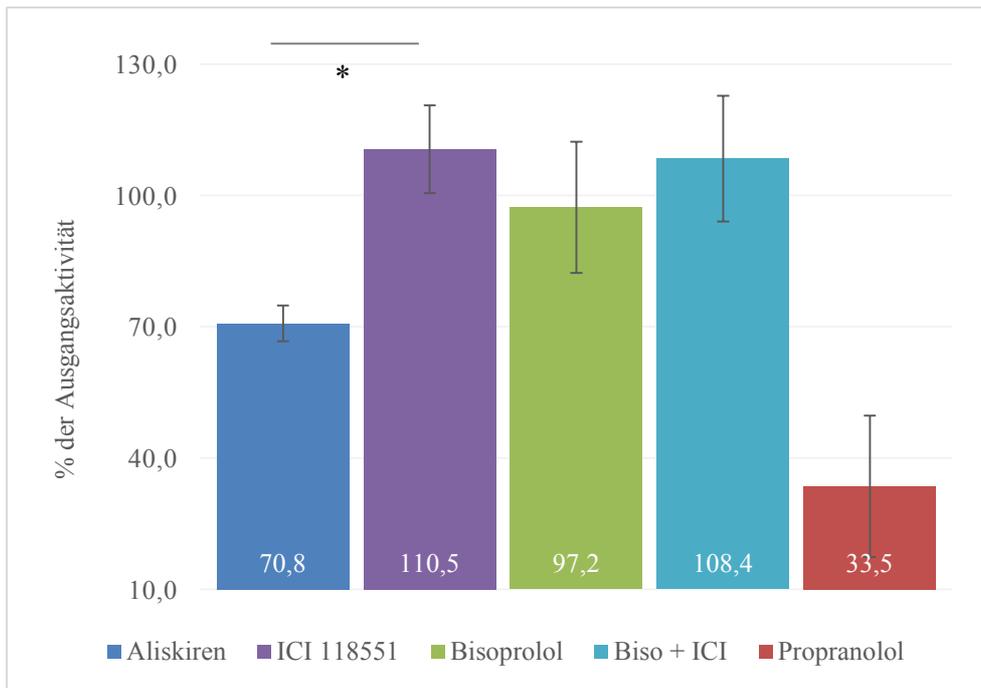


Abb. 29: Quantitative Analyse der Abnahme der Herzfrequenz unter alleiniger Aliskiren-Applikation (n=19) im Vergleich zu zusätzlicher β -Blockade mittels ICI 118551 (n=6), Bisoprolol (n=6), der Kombination beider (n=6) sowie Propranolol (n=5)

Alle Werte sind als Prozent der Ruheaktivität angegeben. Für Aliskiren-Applikation unter ICI 118551 eine signifikante geringere Abnahme der Herzfrequenz als unter alleiniger Aliskiren-Zugabe nachgewiesen werden, Die Fehlerindikatoren zeigen den SEM an. * $p < 0,05$ (zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben, FDR-korrigiert).

Für den Parameter des linksventrikulären Druckes konnte kein signifikanter Effekt zwischen den untersuchten β -Adrenozeptor-Antagonisten und alleiniger Aliskiren-Applikation gefunden werden (ANOVA: Haupteffekt Zwischensubjektfaktoren BETA-ADRENOZEPTOR-ANTAGONIST $F_{(4,25)}=1,93$, $p=0,14$) (s. Abb. 28).

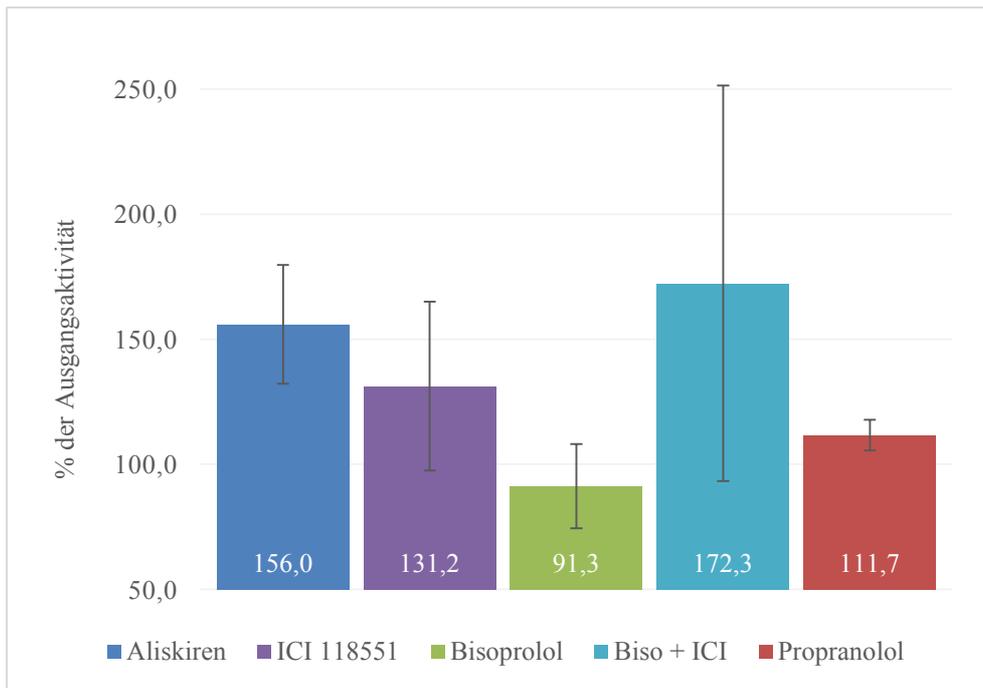


Abb. 30: Quantitative Analyse der Zunahme der Kontraktionskraft unter alleiniger Aliskiren-Applikation (n=19) im Vergleich zu zusätzlicher β -Blockade mittels ICI 118551 (n=6), Bisoprolol (n=6), der Kombination (n=6) beider sowie Propranolol (n=5)

Alle Werte sind als Prozent der Ruhebedingung angegeben. Für keine der Bedingungen konnte ein signifikanter Unterschied zu der alleinigen Aliskiren-Applikation gefunden werden. Die Fehlerindikatoren zeigen den SEM an.

4. DISKUSSION

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente hatten das Ziel die Wirkung des direkten Renin-Inhibitors Aliskiren auf die glatte Muskulatur der Gefäße sowie das isolierte Herz zu untersuchen und in einem weiteren Schritt, mögliche Wirkmechanismen, die für den beobachteten Effekt verantwortlich sein können, zu identifizieren.

Im Folgenden werden nun die zum Einsatz gekommenen Methoden und Ergebnisse dieser Arbeit diskutiert und in einen Zusammenhang mit der bisherigen Literatur gebracht.

4.1. DISKUSSION DER METHODIK

4.1.1. Die Methodik des Organbad

Die im ersten Teil dieser Arbeit zur Anwendung gekommene Methode des Organbads gewährt die in vitro Charakterisierung der Wirkung Aliskirens an funktionell intakten Zellverbänden der eingesetzten Gefäßpräparate. Die gewählten Gefäße der A. iliaca, Aorta abdominalis und Vena porta eignen sich dabei besonders als vaskuläre Modelle.

Da alle präparatorisch sehr gut zugänglich sind, war eine sorgfältige und schnelle Präparation und daraus folgende vollständig funktionelle Intaktheit als Grundvoraussetzung zur Vermeidung von Messfehlern schnell auf hohem Niveau gegeben. Zudem erlauben die unterschiedlichen physiologischen Eigenschaften der Gefäßpräparate eine möglichst umfassende Charakterisierung der Wirkung von Aliskiren. Dabei bilden Aorta abdominalis sowie Arteria iliaca einerseits und Portalvene andererseits sowohl zentral arterielle als auch venöse Gefäße mit ihrem differenzierten Wandaufbau ab. Die Portalvene zeichnet sich zusätzlich durch eine regelmäßige Spontanaktivität aus.

Neben präparatorischen Fehlern, können zusätzliche Messfehler während der Durchführung der Organbadversuche auftreten. Um diese möglichst gering zu halten, wurden mögliche Einflussfaktoren gewissenhaft überprüft. Da sowohl die Umgebungstemperatur als auch der pH-Wert einen großen Einfluss auf die Vasomotorik haben können, sollten jene präzise kontrolliert und reguliert werden. Hierfür diente einerseits eine Wärmepumpe, welche sowohl das Organbad als auch die Vorratsgefäße mit frischer Krebs-Henseleit-Lösung auf eine konstante Temperatur von 37°C einstellte. Andererseits sorgte die durchgehende Begasung der, für jede Messung frisch hergestellten, Lösungen mit Carbogen für eine Stabilisierung des Bicarbonatpuffers und damit für die Aufrechterhaltung des pH-Wertes von 7,4 (Golenhofen

1965; Golenhofen and Loh 1970; Milenov and Golenhofen 1983). Eine zusätzliche Einflussgröße auf die Motorik der Gefäße stellt die Vordehnung der Präparate dar. Um dafür zu kontrollieren und einheitliche Versuchsbedingungen zu gewährleisten, wurden die Präparate nach Einbringen in das Organbad und einer einstündigen Akkommodation auf 5 bis 10 mN vorgedehnt. Des Weiteren wurden vor jedem Experiment die mechanischen Messtransducer mittels eines Messinggewichts (10mN) geeicht.

Eine weitere Limitation kann der teilweise geringe Stichprobenumfang der einzelnen Versuchsreihen darstellen. Jedoch gelang in der Gesamtheit aufgrund der Auswahl der verschiedenen Gefäßmodelle mit ihren unterschiedlichen funktionell physiologischen Eigenschaften und des weiten Spektrums an Versuchsreihen eine umfangreiche Charakterisierung der Wirkung Aliskirens.

4.1.2. Die Methodik des Langendorff-Herzen

Aufgrund der Ergänzung der im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit verwendeten Methode des Langendorff-Herzen, welche es nicht nur erlaubt, Aussagen über die pharmakologischen Effekte Aliskirens auf die Vasomotorik der Koronararterien zu treffen, sondern gleichzeitig auch die myokardiale Funktion und die kardiale elektrisch rhythmische Aktivität zu beurteilen, wird die umfassende Charakterisierung der Wirkung Aliskirens zusätzlich ermöglicht.

Für den Erhalt der Funktionalität der Präparate und die damit einhergehende Vermeidung von Messfehlern, war es notwendig während der Präparation einiges zu beachten. Sowohl Thromben in den Koronararterien und Ventrikeln als auch Myokardischämien würden die Präparateigenschaften nachhaltig beeinträchtigen. Um dieses zu umgehen, erfolgte auf der einen Seite unmittelbar nach der Thorakotomie eine gewichtsadaptierte Heparin-Injektion in das Herz. Auf der anderen Seite wurde die Ischämiezeit, also die Zeit von Explantation bis zur Reperfusion in der Langendorff-Apparatur, so kurz wie möglich gehalten und das explantierte Herz zur Gewebeschonung zusätzlich währenddessen in eisgekühlter Präparierlösung aufbewahrt.

Messfehler während der Durchführung der Langendorff-Experimente können ebenso die Messergebnisse beeinflussen. Wie zuvor im Organbad, sind die Temperatur und der pH-Wert Einflussgrößen für die Herzfunktion und sollten dementsprechend kontrolliert und eingestellt werden. Hierfür sorgte einerseits ein Thermostat, welches sowohl die Krebs-Henseleit-

Lösung als auch die Flüssigkeit im doppelwandigen Versuchsaufbau auf eine konstante Temperatur von 37°C regulierte. Andererseits sorgte die durchgehende Begasung der Krebs-Henseleit-Lösung mit Carbogen über einen in den Boden der Vorratsgefäße eingelassenen Mikrofilter für die Aufrechterhaltung des pH-Wertes von 7,4. Zudem ist ein konstanter Perfusatfluss Voraussetzung für einheitliche Versuchsbedingungen und Aussagen über den Perfusionsdruck der Koronararterien. Hierfür diente eine peristaltische Pumpe, deren Flussmenge vor jeder Messung auf 2 ml/min geeicht wurde. Ebenfalls wurden die verwendeten Drucktransducer mittels Wassersäule vor jedem Experiment geeicht.

4.2. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

4.2.1. Die Wirkung von Aliskiren auf die tonische Aktivität der glatten Gefäßmuskulatur der A. iliaca und der Aorta abdominalis

An beiden Gefäßpräparaten wurde die Wirkung von Aliskiren unter Voraktivierung mit Vasopressin untersucht. Vasopressin führt an den glatten Muskelzellen der Gefäßmuskulatur über die Bindung von vornehmlich V_{1a} -Rezeptoren zu einer Vasokonstriktion (Mavani 2015). In Vasopressin-Konzentrationen im nM-Bereich kommt es dabei über die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) zu einer Inositol-1,4,5-triphosphat-vermittelten (IP_3) Calcium-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (Thibonnier 1992; Nemenoff 1998; Henderson and Byron 2006). Erwähnenswert ist, dass im Rahmen von pathophysiologischen Veränderungen bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen durchaus Zustände erhöhter basaler Vasopressin-Spiegel vorherrschen können (Cowley et al. 1981; Share and Crofton 1982; Kawano et al. 1997). Dementsprechend ist die vorgenommene Voraktivierung mit 3nmol/l Vasopressin durchaus von Relevanz für den Organismus.

Unter Vasopressin-Voraktivierung führte Aliskiren am Modell der A. iliaca zu einer signifikanten und dosisabhängigen Vasodilatation mit einer Abnahme des Gefäßtonus um durchschnittlich 26% unter der höchsten verwendeten Aliskiren-Konzentration von 50 μ mol/l (s. Abb. 5 und 6). Jedoch ließ sich schon ab einer Dosierung von 3 μ mol/l eine signifikante Reduktion des Gefäßtonus um circa 13% nachweisen. Eine vergleichbare Gefäßreaktion, nämlich eine Annahme des Vasotonus um durchschnittlich 23% unter 50 μ mol/l Aliskiren-Dosierung, konnte ebenfalls für die Aorta abdominalis gezeigt werden (s. Abb. 10 und 11).

Des Weiteren konnte in Kontrollexperimenten mittels Time-matched-Versuche an der A. iliaca die zuvor beschriebene Abnahme des Vasotonus als eine Aliskiren-vermittelt Wirkung verifiziert werden. Parallel zu der Versuchsdurchführung mit Aliskiren unter Vasopressin-Voraktivierung wurde der Verlauf des Gefäßtonus unter ausschließlicher Vasopressin-Voraktivierung beobachtet. Dabei zeigte sich eine deutlich geringere Gefäßrelaxation unter Kontrollbedingungen als unter additiver Aliskiren-Applikation.

Die aufgezeigten Ergebnisse stützen die in experimentellen und klinischen Arbeiten nachgewiesene effektive Blutdruckreduktion von Aliskiren. So konnten Wood und Kollegen in tierexperimentellen Arbeiten an Krallenäffchen und Ratten eine effektive antihypertensive Wirkung zeigen (Wood et al. 2005). In klinischen Studien konnte zudem der therapeutische Nutzen Aliskirens für die arterielle Hypertonie als Monotherapie oder als Kombinationstherapie wiederholt belegt werden (Stanton et al. 2003; Gradman et al. 2005; Duprez et al. 2008; Schmieder et al. 2009).

Zeitgleich erweitern die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die existierende Datenlage um einen zusätzlichen Erklärungsansatz für die Wirkung von Aliskiren. Im klassischen Verständnis des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems sollte der direkte Renin-Inhibitor seine Wirkung am primären Zielorgan der Niere entfalten und dort über die renale Blockade zu einer Abnahme der Angiotensin II-Wirkung und damit zu einer Vasodilatation und vermehrten Wasserausscheidung mit der Konsequenz der Blutdrucksenkung führen. Die vorliegende Arbeit zeigte jedoch eine lokale Wirkung Aliskirens an isolierten Gefäßen, unabhängig eines renalen RAAS und der Senkung systemischer Angiotensin II-Spiegel.

Eine mögliche Erklärung des nachgewiesenen vasodilatatorischen Effekts von Aliskiren basiert auf einem lokalen, in den Gefäßsystemen der A. iliaca und Aorta abdominalis immanenten RAAS. Es wird davon ausgegangen, dass zirkulierendes renal generiertes Renin in die glatte Gefäßmuskel- sowie Endothelzelle aufgenommen und demgemäß Angiotensin I und Angiotensin II lokal generiert werden können (Dzau 1984; Kifor and Dzau 1987; Rosenthal et al. 1990; Lutterotti et al. 1994; Hilgers et al. 2001; Carey and Siragy 2003; Atlas 2007). Wohlmöglich konnte Aliskiren auf diese Weise an den isolierten Gefäßpräparaten der Aorta abdominalis und A. iliaca die lokale Synthese von Angiotensin I aus Angiotensinogen und letztlich auch von Angiotensin II (Pool et al. 2007; Brown 2008) inhibieren. Mit der Inhibition der Synthese von Angiotensin II einhergehend, kam es dann zu einer Hemmung der AT₁-Rezeptor-vermittelten Vasokonstriktion (De Gasparo et al. 2000; Paul 2006).

Zudem bleibt zu diskutieren, inwieweit das Endothel in den Präparaten der A. iliaca und Aorta abdominalis Anteil an der beobachteten Vasodilatation hat. Aktuelle humanexperimentelle Daten deuten darauf hin, dass Aliskiren die Endothel-abhängige Vasodilatation und Verfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) in den peripheren Widerstandsgefäßen verbessert (Virdis et al. 2012). In weiteren tierexperimentellen Arbeiten konnte zudem nachgewiesen werden, dass Aliskiren die Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid erhöht (Imanishi et al. 2008) und zu einer Verbesserung der endothelabhängigen Vasodilatation der Aorta thoracica im hypertensiven Rattenmodell beiträgt (Gu et al. 2016). Zudem konnte anhand des Modells der endothelialen Dysfunktion die Bedeutung des lokalen RAAS für die endotheliale Funktion bestätigt werden (Flavahan et al. 2016). Jedoch wie anfänglich erwähnt, beruhen diese Beobachtungen vollständig auf einer systemischen Wirkung Aliskiren im Organismus. Inwieweit diese Prozesse auch am isolierten Gefäß auftreten und inwieweit die beobachtete Relaxation tatsächlich endothelabhängig ist, kann anhand der durchgeführten Experimente an der A. iliaca und Aorta abdominalis nicht detailliert beantwortet werden und bleibt Gegenstand zukünftiger Untersuchungen. Lag diese Fragestellung auch nicht im Fokus der vorliegenden Arbeit, welche einen Überblick über die Wirkung Aliskirens an isolierten für das Herz-Kreislauf-System relevanten Organen abbilden sollte.

In einem weiteren Schritt wurde an beiden Gefäßpräparaten die Wirkung von Aliskiren unter elektrischer Voraktivierung mit einer erhöhten extrazellulären Kalium-Konzentration untersucht. Da die entstehende tonische Vasokonstriktion über eine Verschiebung des Membranpotentials in Richtung Depolarisation erfolgt und damit die Öffnungswahrscheinlichkeit von Calcium-Kanälen erhöht wird, entsteht diese Aktivierung unabhängig von Änderungen am Transmitter- oder Hormonhaushalt.

Für die Voraktivierung mit Kalium konnte jedoch weder an der A. iliaca noch an der Aorta abdominalis ein Effekt auf den Vasotonus beobachtet werden.

Eine mögliche Erklärung könnte in der Abhängigkeit der Wirkung Aliskirens vom Aktivitätszustandes des RAAS liegen. So konnte sowohl in tierexperimentellen als auch in klinischen Studien eine antihypertensive Wirkung stets nur im Organismus mit hochreguliertem RAAS nachgewiesen werden (Bohlender et al. 1997; Wood et al. 2005; Oh et al. 2007). Bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Wistar-Ratten muss allerdings von einer physiologischen Aktivität des RAAS ausgegangen werden. Dass, wie oben bereits

beschrieben, es jedoch unter Voraktivierung mit Vasopressin und damit Voraktivierung des lokalen RAAS zu einer Aliskiren-vermittelten Vasodilatation kam, stützt die Annahme.

Wie im Ergebnisteil beschrieben, konnte die durch Aliskiren ausgelöste Vasodilatation in einer zweiten Versuchsdurchführung nicht reproduziert werden. Trotz des Erneuerns der Lösungen und trotz einer vergleichbaren und adäquaten Vasokonstriktion durch Vasopressin und damit einhergehend vollständigen Funktionsfähigkeit der Präparate fiel die Abnahme des Vasotonus durch Aliskiren in einer zweiten Versuchsdurchführung deutlich geringer aus. Eine mögliche Begründung kann darin liegen, dass Aliskiren beispielsweise das vorhandene Renin irreversibel hemmt oder gegebenenfalls Rezeptoren irreversibel besetzt und diese erst wieder neu gebildet werden müssen, um erneut eine Reaktion hervorzurufen.

4.3. DIE WIRKUNG VON ALISKIREN AUF DIE PHASISCHE AKTIVITÄT DER GLATTEN GEFÄßMUSKULATUR DER PORTALVENE

Die Portalvene zeichnet sich, wie zuvor beschrieben und auch in den Experimenten dargestellt, durch spontane Kontraktionen - die mechanische Spontanaktivität - aus. Diese ist das Resultat elektrischer Spontanaktivität und dient der Steuerung der Kontraktionen

(Funaki and Bohr 1964; Sutter 1990). Ihre Herkunft ist bis dato nicht abschließend geklärt. Diskutiert werden interstitielle Schrittmacherzellen, sogenannte Cajal-Zellen, welche sowohl im spontan aktiven intestinalen Gewebe als auch in der Portalvene nachgewiesen werden konnten (Povstyan et al. 2003; Harhun 2004a; Sanders and Ward 2006; Hennig et al. 2010; Kito 2011). Die Beeinflussung der Spontanaktivität durch eine Vielzahl von Substanzen konnte in zahlreichen Studie gezeigt werden und legt die Schlussfolgerung nahe, dass diverse Rezeptoren und Ionenkanäle von funktioneller Relevanz sind (Funaki and Bohr 1964; Voth et al. 1969; Hamon and Worcel 1982; Winqvist et al. 1989; Mukerji et al. 2000), auf welche später noch einmal eingegangen werden soll.

Am Modell der Portalvene wurde der Effekt Aliskirens ebenfalls unter Voraktivierung mit Vasopressin untersucht. Dabei konnte eine biphasische Reaktion beschrieben werden (s. Abb. 13 und 14). In niedrigen Konzentrationsbereichen hatte Aliskiren eine inhibitorische Wirkung und führte zu einer Abnahme der mechanischen Aktivität des basalen Tonus sowie der Frequenz der Spontanaktivität und Höhe der Amplituden der spontanen Kontraktionen. In hohen Konzentrationsbereichen kehrte sich dieser Effekt jedoch um und es kam zu einer Exzitation mit Anstieg der mechanischen Aktivität und der Frequenz der Spontanaktivität.

Der beobachtete hemmende Einfluss Aliskirens auf die Portalvene wird durch Daten von Chang und Kollegen unterstützt (Chang et al. 2011). Im Tiermodell der portalen Hypertonie führte Aliskiren zu einer Abnahme des Druckes im Portalsystem. Dass das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System in der Pathogenese und im Erhalt der portalen Hypertonie eine entscheidende Rolle einnimmt und in diesem Fall für die portalen Druckverhältnisse bedeutsam ist, konnte gezeigt werden (Tox and Steffen 2006; Herath 2013). Erneut kann der vasodilatatorische Einfluss auf die Modulation von Stickstoffmonoxid und damit auf eine endothel-abhängige Wirkung zurückgeführt werden (Chang et al. 2011).

Dass wir unter Voraktivierung mit Vasopressin und somit Voraktivierung des RAAS, zumindest teilweise äquivalent zur portalen Hypertonie, eine Aliskiren-vermittelte Vasodilatation beobachten konnten, deckt sich mit den existierenden Daten.

Da jedoch die zweite in hohen Konzentrationen exzitatorische Phase der an der Portalvene beobachteten Aliskiren-Reaktion nicht in Einklang mit den in der Literatur vorhandenen Daten sowie den bisherigen Ergebnissen dieser Arbeit zu bringen war, erfolgten die Untersuchungen ferner unter Kalium-Voraktivierung. Dabei konnte keine nennenswerte Veränderung der mechanischen Aktivität beschrieben werden. Dennoch eignete sich diese Form der Voraktivierung nur bedingt zum Vergleich, da unter ihr die der Portalvene eigene Spontanaktivität vollständig versiegte und somit keine Aussagen über Frequenz und Amplitude der spontanen Kontraktionen mehr möglich waren. Da wir eine exzitatorische Wirkung jedoch in erster Linie auf die Frequenz der Spontanaktivität beobachten konnten, galt unser Augenmerk vor allem jener. Die Untersuchungen der Wirkung von Aliskiren an der Portalvene ohne jegliche Voraktivierung konnten schließlich das unerwartete biphasische Wirkprofil mit einer Zunahme der Frequenz der Spontanaktivität in hohen Dosierungen bestätigen (s. Abb. 16, 17 und 18).

An den vorherigen Präparaten der A. iliaca und Aorta abdominalis ließ sich trotz gleichartig verwendeter Konzentrationen ausschließlich ein inhibitorischer Effekt und keine biphasische Reaktion mit Exzitation in hohen Konzentrationen nachweisen. sodass die Frage naheliegt, ob es sich hierbei um einen anderen beziehungsweise additiven Wirkmechanismus handelt.

Die Spontanaktivität der Portalvene und ihre pharmakologische Beeinflussung sind in der Literatur durch eine Vielzahl von Substanzen und Rezeptoren gut charakterisiert (Funaki and Bohr 1964; Voth et al. 1969; Hamon and Worcel 1982; Winqvist et al. 1989; Mukerji et al. 2000). Im Folgenden werden so die Wirkmechanismen referiert, welche sich substantiell von

der durch Aliskiren-vermittelten Wirkung unterscheiden und somit als zugrundeliegender Mechanismus ausgeschlossen werden konnten:

Die Blockade von L-Typ Calcium-Kanälen führt zu einer deutlichen Reduktion der mechanischen und elektrischen Aktivität bis hin zu einem vollständigen Ausbleiben der Spontanaktivität (Jetley and Weston 1980; Hamilton et al. 1986). Kaliumkanalöffner wie Cromakalim oder Minoxidil führen ebenso zu einem Sistieren der Spontanaktivität (Southerton et al. 1988; Newgreen et al. 1990). Hingegen konnte gezeigt werden, dass eine adrenerge und cholinerge Stimulation (Funaki and Bohr 1964; Voth et al. 1969) sowie Antagonisten von spannungs- und kalziumabhängigen Kaliumkanälen (Suarez-Kurtz et al. 1991; Mukerji et al. 2000) eine Steigerung der mechanischen Aktivität der Portalvene nach sich ziehen. Letzteres deckt sich mit den Untersuchungen der verschiedenen Kalium-Kanal-Blocker in der vorliegenden Arbeit. Dabei konnten die Gemeinsamkeiten mit der Wirkung Aliskirens auf die Teilaspekte der Spontanaktivität noch näher charakterisiert werden (vgl. Tab. 6). Im Kalium-20 mmol/l - Kalium-80 mmol/l – Test, welcher, wie oben ausführlich beschrieben eine Möglichkeit darstellt, einen vermuteten Kaliumkanal-Blocker auf diesen Wirkmechanismus zu testen, ließ sich jedoch für Aliskiren keine entsprechende Reaktion nachweisen, sodass die Hypothese des Antagonismus am einem Kalium-Kanal nicht bestätigt werden konnte (s Abb. 20).

Zu diskutieren bleibt außerdem, dass neben den oben ausgeführten glatten Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen der Portalvene auch die interstitiellen Cajal-Zellen als Zielstruktur der Aliskiren-Wirkung in Frage kommen. Es ist wahrscheinlich, dass Cajal-Zellen und glatte Muskelzellen über Gap Junctions in Verbindung stehen und sie in der Wand der Gefäße als Schrittmacher der elektrischen und somit auch mechanischen Aktivität das Verbindungselement zwischen Muskel und Nerv bilden (Holman et al. 1968; Sutter 1990; Harhun 2004b). Obwohl, nach bester Kenntnis, der Einfluss des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems auf Cajal-Zellen bislang noch nicht erforscht wurde, könnten die Veränderungen der Spontanaktivität der Portalvene durchaus Folge einer Interaktion Aliskirens mit Cajal-Zellen sein und könnte eine Fragestellung für zukünftige Experimente sein.

4.4. DIE WIRKUNG VON ALISKIREN AM LANGENDORFF-HERZEN

Am Langendorff-Herzen sollte der Einfluss von Aliskiren einerseits auf Koronargefäße und andererseits auf die Aktivität des zentralen Organs des Herz-Kreislauf-Systems erfasst werden. Aufgrund der vorhergehenden Experimente wurde an den Koronararterien am ehesten eine Wirkung Aliskirens erwartet, welche jener der A. iliaca und Aorta abdominalis gleicht. Aufgrund der Beobachtungen auf die Spontanaktivität der Portalvene war ebenfalls mit einer Alteration der Herzfrequenz zu rechnen. Wie oben erwähnt, beschränkten sich die Konzentrationsstufen von Aliskiren am Langendorff-Herzen auf 10-50 $\mu\text{mol/l}$, also die Konzentrationen unter welchen an der Portalvene exzitatorische Phänomene mit Anstieg der Frequenz der Spontanaktivität nachgewiesen werden konnten.

Wie in den Präparaten zuvor wurde die Wirkung Aliskirens sowohl unter Vasopressin- als auch Kalium-Voraktivierung und in einem weiteren Schritt ohne jegliche Voraktivierung untersucht. Dabei kam es in allen drei Bedingungen zu einem deutlichen Anstieg des Perfusionsdruckes und damit zu einer Konstriktion der Koronararterien (s. Abb. 21 bis 25).

Ein Teilaspekt dieses Phänomens konnte durch Kontrollexperimente beleuchtet werden. So wurde der Zeitverlauf des Perfusionsdruckes über einen Zeitraum von vier Stunden unter Applikation von 50 $\mu\text{mol/l}$ Aliskiren im Vergleich zu einer elektrischen Aktivierung mit 40 mmol/l Kalium beziehungsweise einer reinen Zeitkontrolle ohne die Applikation einer Testsubstanz erfasst. Dabei konnte zum Endzeitpunkt der Messung kein Unterschied zwischen den einzelnen Bedingungen nachgewiesen und somit gezeigt werden, dass ein Teil der Zunahme des Perfusionsdruckes einem methodischen Problem der Langendorff-Apparatur geschuldet ist. Der verwendeten Perfusionslösung fehlt es an kolloidosmotisch wirksamen Teilchen, sodass anzunehmen ist, dass es zu einem kontinuierlichen Auswärtsstrom von Flüssigkeit in das perivaskuläre Gewebe und somit zu einem zunehmenden interstitiellen Ödem kommt. Über den Zeitraum einer Messung komprimieren diese Ödeme dann möglicherweise die Koronararterien.

Zu erwähnen ist jedoch, dass signifikante Unterschiede zu früheren Zeitpunkten zwischen der Zeitkontrolle und der Aliskiren-Bedingung herausgearbeitet werden konnten. Zudem zeigt sich nach Aliskiren-Applikation teilweise eine steile Zunahme (vgl. Abb. 21 und 24) des Perfusionsdruckes und kein langsames Anschwellen, wie es bei einem kontinuierlichen Prozess zu erwarten wäre. Dieses lässt die Schlussfolgerung zu, dass zusätzliche Phänomene an der Konstriktion der Koronararterien unter Aliskiren eine Rolle spielen. Ein weiteres methodisch bedingtes Problem, welches in diesem Rahmen diskutiert werden sollte, ist die

Möglichkeit von Embolien und dem Verstopfen der Koronararterien durch mögliche nicht vollständig gelöste Pharmakonrückstände. Dieses scheint aufgrund des gewissenhaften Lösens und zusätzlichen Filtrierens durch Mikrofilter eher unwahrscheinlich. Mit dem Austritt der intravaskulären Flüssigkeit könnte es allerdings zusätzlich zu einer Ablagerung und Akkumulation der Substanzen im Gewebe und damit über die Zeit zu einem additiven Effekt gekommen sein. Jedoch konnten makroskopisch keine Ablagerung im Interstitium wahrgenommen werden. Zusätzlich ließ sich die Wirkung von Aliskiren stets, zumindest zum größten Teil, durch Wechseln der Lösungen auswaschen. Zusammenfassend bleibt die beobachtete Konstriktion der Koronararterien aus den oben genannten Gründen jedoch vorsichtig zu interpretieren.

Des Weiteren, mit den oben genannten Einschränkungen im Hinterkopf, konnte am Langendorff-Herzen zusätzlich eine Senkung der Herzfrequenz sowie eine Zunahme des linksventrikulären Druckes unter Aliskiren aufgezeigt werden (s. Abb. 24 und 25). Diese Ergebnisse werden durch experimentelle Daten von Tsai und Kollegen getragen, welche einen positiven inotropen Effekt Aliskirens auf Kardiomyozyten zeigen konnten (Tsai et al. 2011). Die durch Aliskiren verursachte Erhöhung des zytosolischen Calcium konnte mittels Ryanodine, einem spezifischen Antagonisten der Ryanodin-Rezeptoren, deren Aktivierung die Freisetzung von Calcium aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum bewirkt (Lanner 2012), aufgehoben werden (Tsai et al. 2011).

Einerseits könnte anhand dieser Ergebnisse ein experimenteller Nachweis für einen Benefit Aliskirens im Rahmen der Herzinsuffizienztherapie, auf welchen mehrere klinische Studien hindeuten (McMurray et al. 2008; Solomon et al. 2009), gesammelt werden.

Andererseits war die durch Aliskiren-vermittelte positive Inotropie und negative Chronotropie, die in ihrer Kombination an die Wirkung von Beta-Adrenozeptor-Antagonisten erinnert, Ausgangspunkt diese Theorie in weiteren Kontrollexperimenten zu überprüfen. Dabei konnte unter vorheriger Blockade des β_2 -Rezeptors durch ICI 118551 eine signifikant geringere Zunahme des Perfusionsdruckes sowie eine geringe Frequenzabnahme durch Aliskiren erzielt werden. Daraus resultierend ergeben sich Hinweise, dass die Wirkung Aliskirens gewissermaßen über β_2 -Rezeptoren vermittelt werden könnte beziehungsweise wohlmöglich adrenerge Einflüsse für die Wirkung Aliskirens eine Rolle spielen könnten. Dass das RAAS auch adrenerge Rezeptoren beeinflusst, lässt sich anhand der Literatur belegen (Dzau 1984).

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) hat sowohl unter physiologischen Gesichtspunkten für die Regulation des Blutdrucks, des Extrazellulärvolumens und der Gewebepерfusion, als auch an der Pathogenese und Aufrechterhaltung der arteriellen Hypertonie eine zentrale Stellung. Aufgrund des Wirkmechanismus von Aliskiren, die direkte Inhibition von Renin und der damit verbundenen Hemmung der Hydrolyse von Angiotensinogen zu Angiotensin I setzt es am ersten zentralen umsatzbestimmenden Schritts des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems an. Daher bestand bei Markteinführung die Hoffnung auf eine Innovation in der Therapie der arteriellen Hypertonie. In tierexperimentellen Arbeiten konnte neben einer effektiven Blutdrucksenkung ein zusätzlicher kardioprotektiver Effekt Aliskirens beobachtet werden (Wood et al. 2005; Whaley-Connell et al. 2008; De Mello et al. 2013). Die Datenlage hinsichtlich des systemischen Wirkungs- und Nebenwirkungsprofil im klinischen Einsatz und des Benefits für Patienten mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen ist widersprüchlich (Solomon et al. 2009; McMurray et al. 2016).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb die Charakterisierung der Wirkung des direkten Renin-Inhibitors Aliskiren auf isolierte Gefäße und das isolierte Herz - Organe, welche für die Physiologie des Herz-Kreislauf-Systems von außerordentlicher Relevanz sind.

Dazu wurden pharmakologische Untersuchungen an einem breiten Spektrum von glattmuskulären Gefäßpräparate im konventionellen Organbad sowie in einem weiteren Schritt am Langendorff-Herzen durchgeführt.

Die dabei dokumentierten Effekte Aliskirens legen eine Wirkung unabhängig der renalen Inhibition von Renin nahe. So konnte an den isolierten Präparaten der abdominalen Aorta sowie der A. iliaca eine Vasodilatation beschrieben werden. An der Portalvene zeigte ein konzentrationsabhängiger biphasischer Effekt mit neben dieser hemmenden Komponente auf den Vasotonus und Abnahme der Frequenz und Amplitude der Spontanaktivität in niedrigen Konzentrationen eine zusätzliche exzitatorische Komponente in höheren Konzentrationsbereichen mit Anstieg der mechanischen Aktivität und der Frequenz der Spontanaktivität. Dabei ergaben sich keine Hinweise für eine vermutete Interaktion Aliskiren mit Kaliumkanälen als möglicher Mechanismus der beschriebenen Wirkung. Am Langendorff-Herzen konnte eine Vasokonstriktion und Druckerhöhung in den Koronararterien gemessen werden. Diese Ergebnisse des Langendorff-Herzen sollten, wie oben ausführlich diskutiert, sollten allerdings mit Vorsicht interpretiert werden. Gleichzeitig

ergaben sich in der Langendorff-Apparatur jedoch Hinweise auf einen möglichen kardioprotektiven Effekt von Aliskiren mit einer Abnahme der Herzfrequenz und Zunahme des linksventrikulären Drucks. Dabei ergab sich der Anhalt, dass sowohl Frequenzabnahme als auch Vasokonstriktion der Koronararterien, zumindest teilweise, über eine Interaktion von Aliskiren mit β_2 -Rezeptoren vermittelt wird.

Die erhobenen Daten erweitern die bislang beschriebenen Wirkungen Aliskirens im systemischen Tiermodell sowie im klinischen Einsatz und bieten aber zugleich Erklärungsansätze für mögliche Nebenwirkungen. In wieweit die beobachteten Effekte innerhalb der Komplexität der systemischen Regulation in-vivo jedoch bestehen könnten, bleibt Gegenstand weiterer Experimente.

6. THESEN

1. Der direkte Renin-Inhibitor Aliskiren hat - unabhängig des renalen Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems - eine Wirkung auf isolierte Organpräparate. Diese sind organspezifisch.
2. An isolierten arteriellen Gefäßen der A. iliaca und Aorta abdominalis kommt es unter Vasopressin-Voraktivierung zu einer signifikanten und dosisabhängigen Vasodilatation. Diese Ergebnisse erweitern, das Verständnis der durch Aliskiren vermittelten Blutdruckreduktion.
3. Unter elektrischer Voraktivierung mittels erhöhter extrazellulärer Kalium-Konzentration konnte für Aliskiren weder an der A. iliaca noch an der Aorta abdominalis ein Effekt auf den Vasotonus beobachtet werden.
4. An der Portalvene konnte eine biphasische Reaktion Aliskirens beschrieben werden. In niedrigen Konzentrationsbereichen zeigte Aliskiren eine inhibitorische Wirkung und führte zu einer Abnahme der mechanischen Aktivität des basalen Tonus sowie der Frequenz der Spontanaktivität und Höhe der Amplituden der spontanen Kontraktionen. In hohen Konzentrationsbereichen kehrte sich dieser Effekt jedoch um und es kam zu einer Exzitation mit Anstieg der mechanischen Aktivität und der Frequenz der Spontanaktivität.
5. Die Wirkung an der Portalvene wird nicht über einen Antagonismus an Kalium-Kanälen verursacht.
6. Am Langendorff-Herzen bewirkt Aliskiren eine Vasokonstriktion und führt zu einer Druckerhöhung in den Koronararterien.

7. Am Langendorff-Herzen kommt es zusätzlich zu einer Senkung der Herzfrequenz sowie einer Zunahme des linksventrikulären Druckes unter Aliskiren.

8. Für die Aliskiren-Wirkung am Langendorff-Herzen könnten β_2 -Rezeptoren eine Rolle spielen.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Admiraal PJJ, van Kesteren CAM, Danser AHJ, Derkx FHM, Sluiter W, Schalekamp MADH. 1999. Uptake and proteolytic activation of prorenin by cultured human endothelial cells. *Journal of Hypertension*. 17:621.
- Atlas S. 2007. The Renin-Angiotensin Aldosterone System: Pathophysiological Role and Pharmacologic Inhibition. 1–12.
- Atlas SA, Case DB, Yu ZY, Laragh JH. 1984. Hormonal and metabolic effects of angiotensin converting enzyme inhibitors. Possible differences between enalapril and captopril. *Am J Med*. 77:13–17.
- Azizi M, Chatellier G, Guyene TT, Murieta-Geoffroy D, Ménard J. 1995. Additive effects of combined angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II antagonism on blood pressure and renin release in sodium-depleted normotensives. *Circulation*. 92:825–834.
- Batenburg WW, Garrelds IM, Bernasconi CC, Juillerat-Jeanneret L, Van Kats JP, Saxena PR, Danser A. 2004. Angiotensin II type 2 receptor - Mediated vasodilation in human coronary microarteries. *Circulation*. 109:2296–2301.
- Batenburg WW, Tom B, Schuijt MP, Danser A. 2005. Angiotensin II type 2 receptor-mediated vasodilation. Focus on bradykinin, NO and endothelium-derived hyperpolarizing factor(s). *Vascular Pharmacology*. 42:109–118.
- Benjamini Y, Hochberg Y. 1995. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)*. 57:289-300.
- Bilski AJ, Halliday SE, Fitzgerald JD. 1983. The Pharmacology of a [beta] 2-Selective Adrenoceptor Antagonist (ICI 118,551). *J Cardiovasc Pharmacol*.
- Bohlender J, Fukamizu A, Lippoldt A, Nomura T, Dietz R, Ménard J, Murakami K, Luft FC, Ganten D. 1997. High human renin hypertension in transgenic rats. *Hypertension*. 29:428–434.
- Brem AS. 2009. The Janus effect: two faces of aldosterone. *Kidney Int*. 75:137–139.
- Brown MJ. 2006. Direct renin inhibition a new way of targeting the renin system. *Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System*. 7:S8.
- Brown MJ. 2008. Aliskiren. *Circulation*. 118:773–784.
- Brown MJ, McInnes GT, Papst CC, Zhang J, MacDonald TM. 2011. Aliskiren and the calcium channel blocker amlodipine combination as an initial treatment strategy for hypertension control (ACCELERATE): a randomised, parallel-group trial. *The Lancet*. 377:312–320.
- Brown NJ, Vaughan MDE. 1998. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors. *Circulation*. 1–11.
- Brueggemann LI, Moran CJ, Barakat JA, Yeh JZ, Cribbs LL, Byron KL. 2006. Vasopressin stimulates action potential firing by protein kinase C-dependent inhibition of KCNQ5 in A7r5 rat aortic smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 292:H1352–H1363.
- Brunner HR, Gavras H, Turini GA, Waeber B, Cappuis P, McKinstry DN. 1978. Long-term treatment of hypertension in man by an orally active angiotensin-converting enzyme

- inhibitor. *Clin Sci Mol Med Suppl.* 4:293s–295s.
- Byron K, Taylor CW. 1995. Vasopressin stimulation of Ca²⁺ mobilization, two bivalent cation entry pathways and Ca²⁺ efflux in A7r5 rat smooth muscle cells. *J Physiol (Lond).* 485 (Pt 2):455–468.
- Byron KL, Lucchesi PA. 2002. Signal transduction of physiological concentrations of vasopressin in A7r5 vascular smooth muscle cells. A role for PYK2 and tyrosine phosphorylation of K⁺ channels in the stimulation of Ca²⁺ spiking. *J Biol Chem.* 277:7298–7307.
- Carey RM, Siragy HM. 2003. Newly Recognized Components of the Renin-Angiotensin System: Potential Roles in Cardiovascular and Renal Regulation. *Endocrine Reviews.* 24:261–271.
- Carini DJ, Christ DD, Duncia JV, Pierce ME. 1998. The discovery and development of angiotensin II antagonists. *Pharm Biotechnol.* 11:29–56.
- Case DB, Atlas SA, Laragh JH, Sealey JE, Sullivan PA, McKinstry DN. 1978. Clinical experience with blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system by an oral converting-enzyme inhibitor (SQ 14,225, captopril) in hypertensive patients. *Prog Cardiovasc Dis.* 21:195–206.
- Chai W, Danser AHJ. 2005. Is angiotensin II made inside or outside of the cell? *Current Science Inc.* 7:124–127.
- Chang C-C, Lee W-S, Huang H-C, Lee F-Y, Wang S-S, Lin H-C, Nong J-Y, Lee S-D. 2011. Aliskiren reduces portal pressure in portal hypertensive rats. *European Journal of Clinical Investigation.* 42:526–533.
- Cherezov V, Rosenbaum DM, Hanson MA, Rasmussen SGF, Thian FS, Kobilka TS, Choi HJ, Kuhn P, Weis WI, Kobilka BK, Stevens RC. 2007. High-Resolution Crystal Structure of an Engineered Human 2-Adrenergic G Protein-Coupled Receptor. *Science.* 318:1258–1265.
- Cowley AW, Cushman WC, Quillen EW, Skelton MM, Langford HG. 1981. Vasopressin elevation in essential hypertension and increased responsiveness to sodium intake. *Hypertension.* 3:193–1100.
- 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. 2002. Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *The Lancet.* 359:995–1003.
- Danser AHJ, Derkx FHM, Schalekamp MADH, Hense H-W, Riegger GAJ, Schunkert H. 1998. Determinants of interindividual variation of renin and prorenin concentrations: evidence for a sexual dimorphism of (pro)renin levels in humans. *Journal of Hypertension.* 16:853.
- Danser AHJ, Vandendorpel MA, Deinum J, Derkx F, Franken A, Peperkamp E, Dejong P, Schalekamo M. 1989. Renin, Prorenin, and Immunoreactive Renin in Vitreous Fluid From Eyes with and Without Diabetic-Retinopathy. *J Clin Endocrinol Metab.* 68:160–167.
- Danser AHJ, Schalekamp MA. 1996. Is there an internal cardiac renin-angiotensin system? *Heart.* 76:28–32.
- Danser AHJ, Van Kats JP, Admiraal PJ, Derkx FH, Lamers JM, Verdouw PD, Saxena PR,

- Schalekamp MA. 1994. Cardiac renin and angiotensins. Uptake from plasma versus in situ synthesis. *Hypertension*. 24:37–48.
- Danser AHJ. 2010. Cardiac angiotensin II: does it have a function? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 299:H1304–H1306.
- Danser AHJ, Deinum J. 2005. Renin, Prorenin and the Putative (Pro)renin Receptor. *Hypertension*. 46:1069–1076.
- Danser AHJ, van Kesteren CAM, Bax WA, Tavenier M, Derkx FHM, Saxena PR, Schalekamp MADH. 1997. Prorenin, Renin, Angiotensinogen, and Angiotensin-Converting Enzyme in Normal and Failing Human Hearts : Evidence for Renin Binding. *Circulation*. 96:220–226.
- De Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. 2000. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev*. 52:415–472.
- De Lannoy LM, Danser AHJ, Bouhuizen AMB, Saxena PR, Schalekamp MADH. 1998. Localization and Production of Angiotensin II in the Isolated Perfused Rat Heart. *Hypertension*. 31:1111–1117.
- De Lannoy LM, Danser AHJ, Van Kats JP, Schoemaker RG, Saxena PR, Schalekamp MADH. 1997. Renin-Angiotensin System Components in the Interstitial Fluid of the Isolated Perfused Rat Heart : Local Production of Angiotensin I. *Hypertension*. 29:1240–1251.
- De Mello W, Rivera M, Rabell A, Gerena Y. 2013. Aliskiren, at low doses, reduces the electrical remodeling in the heart of the TGR(mRen2)27 rat independently of blood pressure. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 14:23–33.
- Deinum J, Ronn B, Mathiesen E, Derkx F, Hop W, Schalekamp M. 1999. Increase in serum prorenin precedes onset of microalbuminuria in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetologia*. 42:1006–1010.
- Deitmer P, Golenhofen K, Noack T. 1992. Comparison of the relaxing effects of cicletanine and cromakalim on vascular smooth muscle. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 20:35–42.
- Delabays A, Nussberger J, Porchet M, Waeber B, Hoyos P, Boger R, Glassman H, Kleinert HD, Luther R, Brunner HR. 1989. Hemodynamic and humoral effects of the new renin inhibitor enalkiren in normal humans. *Hypertension*. 13:941–947.
- Di Bacco A, Gill G. 2003. Oncogene - Abstract of article: The secreted glycoprotein CREG inhibits cell growth dependent on the mannose-6-phosphate//insulin-like growth factor II receptor. *Oncogene*.
- Dickstein K, Kjekshus J, OPTIMAAL Steering Committee of the OPTIMAAL Study Group. 2002. Effects of losartan and captopril on mortality and morbidity in high-risk patients after acute myocardial infarction: the OPTIMAAL randomised trial. *Optimal Trial in Myocardial Infarction with Angiotensin II Antagonist Losartan*. *The Lancet*. 360:752–760.
- Docherty JR. 2009. Subtypes of functional α 1-adrenoceptor. *Cell Mol Life Sci*. 67:405–417.
- Duprez DA, Davis P, Botha J. 2008. The AGELESS Study: The effect of aliskiren vs ramipril alone or in combination with hydrochlorothiazide and amlodipine in patients ≥ 65 years of age with systolic hypertension. *Circulation*.
- Dzau VJ. 1984. Vascular Wall Renin-Angiotensin Pathway in Control of the Circulation. *Am J Med*. 77:31–36.

- Edwards G, Henshaw M, Miller M, Weston AH. 1991. Comparison of the effects of several potassium-channel openers on rat bladder and rat portal vein in vitro. *British Journal of Pharmacology*. 102:679–686.
- Feldman DL, Jin L, Xuan H, Contrepas A, Zhou Y, Webb RL, Mueller DN, Feldt S, Cumin F, Maniara W, Persohn E, Schuetz H, Jan Danser AH, Nguyen G. 2008. Effects of Aliskiren on Blood Pressure, Albuminuria, and (Pro)Renin Receptor Expression in Diabetic TG(mRen-2)27 Rats. *Hypertension*. 52:130–136.
- Ferrario CM. 2006. Role of angiotensin II in cardiovascular disease therapeutic implications of more than a century of research. *Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System*. 7:3–14.
- Flather MD, Yusuf S, Kober L, Pfeffer M, Hall A, Murray G, Torp-Pedersen C, Ball S, Pogue J, Moye L, Braunwald E, C AIMI. 2000. Long-term ACE-inhibitor therapy in patients with heart failure or left-ventricular dysfunction: a systematic overview of data from individual patients. *The Lancet*. 355:1575–1581.
- Flavahan S, Chang F, Flavahan NA. 2016. Local renin-angiotensin system mediates endothelial dilator dysfunction in aging arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 311:H849–H854.
- Fox KM, EUROpean trial On reduction of cardiac events with Perindopril in stable coronary Artery disease Investigators. 2003. Efficacy of perindopril in reduction of cardiovascular events among patients with stable coronary artery disease: randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial (the EUROPA study). *Lancet*. 362:782–788.
- Franzosi MG, Santoro E, Zuanetti G, Baigent C, Collins R, Flather M, Kjekshus J, Latini R, Liu LS, Maggioni AP, Sleight P, Swedberg K, Tognoni G, Yusuf S, Tavazzi L, Ball S, Kober L, Torp-Pedersen C, Braunwald E, Moye L, Pfeffer M, Santoro L, Pogue J, Wang Y, Collaborat AIMI. 1998. Indications for ACE inhibitors in the early treatment of acute myocardial infarction - Systematic overview of individual data from 100,000 patients in randomized trials. *Circulation*. 97:2202–2212.
- Funaki S, Bohr DF. 1964. Electrical and mechanical activity of isolated vascular smooth muscle of the rat. *Nature*. 203:192–194.
- Funder J. 2001. Mineralocorticoids and cardiac fibrosis: the decade in review. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 28:1002–1006.
- Furchgott RF, Cherry PD, Zawadzki JV, Jothianandan D. 1984. Endothelial-Cells as Mediators of Vasodilation of Arteries. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 6:S336–S343.
- Furchgott RF, Zawadzki JV. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholin. *Nature*. 288:373–376.
- Garcia ML, Knaus HG, Munujos P, Slaughter RS, Kaczorowski GJ. 1995. Charybdotoxin and its effects on potassium channels. *Am J Physiol*. 269:C1–C10.
- Gohlke P, Pees C, Unger T. 1998. AT2 receptor stimulation increases aortic cyclic GMP in SHRSP by a kinin-dependent mechanism. *Hypertension*. 31:349–355.
- Golenhofen K. 1965. Rhythmische Dehnung Der Glatten Muskulatur Vom Blinddarm Des Meerschweinchens. *Pflugers Archiv Fur Die Gesamte Physiologie Des Menschen Und Der Tiere*. 284:327.
- Golenhofen K. 1983. Untersuchungen am isolierten glatten Muskel. *Gastrointestinale Motilität-klinische Untersuchungsmethoden Edition Medizin Weinheim, Weinheim-*

Deerfield Beach, Florida-Basel, 139-149

- Golenhofen K, Loh von D. 1970. Elektrophysiologische Untersuchungen zur normalen Spontanaktivität der isolierten *Taenia coli* des Meerschweinchens. *Pflügers Archiv*. 312–328.
- Gradman AH, Schmieder RE, Lins RL, Nussberger J. 2005. Aliskiren, a Novel Orally Effective Renin Inhibitor, Provides Dose-Dependent Antihypertensive Efficacy and Placebo-Like Tolerability in Hypertensive Patients | *Circulation*. *Circulation*.
- Groskopf JC, Syu L-J, Saltiel AR, Linzer DIH. 1997. Proliferin Induces Endothelial Cell Chemotaxis through a G Protein-Coupled, Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent Pathway 1. *Endocrinology*. 138:2835–2840.
- Gu Y, Tang X, Xie L, Meng G, Ji Y. 2016. Aliskiren improves endothelium-dependent relaxation of thoracic aorta by activating PI3K/Akt/eNOS signal pathway in SHR. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 43:450–458.
- Guilluy C, Jerembe G, Toumaniantz G, Rolli-Derkinderen M, Retailleau K, Loufrani L, Henrion D, Scalbert E, Bril A, Torres RM, Offermanns S, Pacaud P, Loirand G. 2010. The Rho exchange factor Arhgef1 mediates the effects of angiotensin II on vascular tone and blood pressure. *Nature Medicine*. 16:183–190.
- Haberman E. 1984. Apamin. *Pharmac Ther*. 1–16.
- Hamilton TC, Weir SW, Weston AH. 1986. Comparison of the effects of BRL 34915 and verapamil on electrical and mechanical activity in rat portal vein. *British Journal of Pharmacology*. 88:103–111.
- Hamon G, Worcel M. 1982. Mechanism of action of angiotensin II on excitation-contraction coupling in the rat portal vein. *British Journal of Pharmacology*. 75:425–432.
- Hannan RE, Davis EA, Widdop RE. 2003. Functional role of angiotensin II AT 2receptor in modulation of AT 1receptor-mediated contraction in rat uterine artery: involvement of bradykinin and nitric oxide. *British Journal of Pharmacology*. 140:987–995.
- Harhun MI. 2004. Function of Interstitial Cells of Cajal in the Rabbit Portal Vein. *Circulation Research*. 95:619–626.
- Harvey AL, Anderson AJ. 1985. Dendrotoxins: snake toxins that block potassium channels and facilitate neurotransmitter release. *Pharmacology & therapeutics*.
- Henderson KK, Byron KL. 2006. Vasopressin-induced vasoconstriction: two concentration-dependent signaling pathways. *Journal of Applied Physiology*. 102:1402–1409.
- Hennig GW, Spencer NJ, Jokela-Willis S, Bayguinov PO, lee HT, ritchie LA, ward SM, smith TK, sanders KM. 2010. ICC-MY coordinate smooth muscle electrical and mechanical activity in the murine small intestine. *Neurogastroenterol Motil*. 22:e138–e151.
- Herath CB. 2013. Therapeutic potential of targeting the renin angiotensin system in portal hypertension. *WJGP*. 4:1.
- Hilgers KF, Veelken R, Muller DN, Kohler H, Hartner A, Botkin SR, Stumpf C, Schmieder RE, Gomez RA. 2001. Renin Uptake by the Endothelium Mediates Vascular Angiotensin Formation. *Hypertension*. 38:243–248.
- Holman ME, Kasby CB, Suthers MB, Wilson JA. 1968. Some properties of the smooth muscle of rabbit portal vein. *J Physiol (Lond)*. 196:111–132.
- Hornig B, Kohler C, Drexler H. 1997. Role of bradykinin in mediating vascular effects of

- angiotensin-converting enzyme inhibitors in humans. *Circulation*. 95:1115–1118.
- Ihara M, Urata H, Kinoshita A, Suzumiya J, Sasaguri M, Kikuchi M, Ideishi M, Arakawa K. 1999. Increased Chymase-Dependent Angiotensin II Formation in Human Atherosclerotic Aorta. *Hypertension*. 33:1399–1405.
- Imanishi T, Tsujioka H, Ikejima H, Kuroi A, Takarada S, Kitabata H, Tanimoto T, Muragaki Y, Mochizuki S, Goto M, Yoshida K, Akasaka T. 2008. Renin Inhibitor Aliskiren Improves Impaired Nitric Oxide Bioavailability and Protects Against Atherosclerotic Changes. *Hypertension*. 52:563–572.
- Imredy JP, MacKinnon R. 2000. Energetic and structural interactions between δ -dendrotoxin and a voltage-gated potassium channel. *Journal of Molecular Biology*. 296:1283–1294.
- Iwai N, Izumi M, Inagami T, Kinoshita M. 1997. Induction of renin in medial smooth muscle cells by balloon injury. *Hypertension*. 29:1044–1050.
- Jetley M, Weston AH. 1980. Some effects of sodium nitroprusside, methoxyverapamil (D600) and nifedipine on rat portal vein. *British Journal of Pharmacology*. 68:311–319.
- Juillerat L, Nussberger J, Ménard J, Mooser V, Christen Y, Waeber B, Graf P, Brunner HR. 1990. Determinants of angiotensin II generation during converting enzyme inhibition. *Hypertension*. 16:564–572.
- Kamishima T, McCarron JG. 1996. Depolarization-evoked increases in cytosolic calcium concentration in isolated smooth muscle cells of rat portal vein. *J Physiol (Lond)*. 492 (Pt 1):61–74.
- Katz SA, Opsahl JA, Forbis LM. 2001. Myocardial enzymatic activity of renin and cathepsin D before and after bilateral nephrectomy. *Basic Research in Cardiology*. 96:659–668.
- Katz SA, Opsahl JA, Lunzer MM, Forbis LM, Hirsch AT. 1997. Effect of Bilateral Nephrectomy on Active Renin, Angiotensinogen, and Renin Glycoforms in Plasma and Myocardium. *Hypertension*. 30:259–266.
- Kawano Y, Matsuoka H, Nishikimi T, Takishita S, Omae T. 1997. The role of vasopressin in essential hypertension. Plasma levels and effects of the V1 receptor antagonist OPC-21268 during different dietary sodium intakes. *American Journal of Hypertension*. 10:1240–1244.
- Kifor I, Dzau VJ. 1987. Endothelial renin-angiotensin pathway: evidence for intracellular synthesis and secretion of angiotensins. *Circulation Research*. 60:422–428.
- Kiowski W, Lüscher TF, Linder L, Bühler FR. 1991. Endothelin-1-induced vasoconstriction in humans. Reversal by calcium channel blockade but not by nitrovasodilators or endothelium-derived relaxing factor. *Circulation*. 83:469–475.
- Kito Y. 2011. The functional role of intramuscular interstitial cells of Cajal in the stomach. *J Smooth Muscle Res*. 47:47–53.
- Klingbeil AU, Schneider M, Martus P, Messerli FH, Schmieder RE. 2003. A meta-analysis of the effects of treatment on left ventricular mass in essential hypertension. *Am J Med*. 115:41–46.
- Kobrin I, Viskoper RJ, Laszt A, Bock J, Weber C, Charlon V. 1993. Effects of an Orally Active Renin Inhibitor, Ro 42-5892, in Patients with Essential-Hypertension. *American Journal of Hypertension*. 6:349–356.
- Koh KK, Ahn JY, Han SH, Kim DS, Jin DK, Kim HS, Shin M-S, Ahn TH, Choi IS, Shin EK. 2003. Pleiotropic effects of angiotensin II receptor blocker in hypertensive patients. *J Am*

- Coll Cardiol. 42:905–910.
- Lanner JT. 2012. *Ryanodine Receptor Physiology and Its Role in Disease*. Dordrecht: Springer Netherlands.
- Laragh JH, Sealey JE. 1992. *Renin-Angiotensin-Aldosterone System and the Renal Regulation of Sodium, Potassium, and Blood Pressure Homeostasis, Comprehensive Physiology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Law MR, Morris JK, Wald NJ. 2009. Use of blood pressure lowering drugs in the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of 147 randomised trials in the context of expectations from prospective epidemiological studies. *BMJ*. 338:b1665–b1665.
- Lee VC, Rhew DC, Dylan M, Badamgarav E, Braunstein GD, Weingarten SR. 2004. Meta-analysis: Angiotensin-receptor blockers in chronic heart failure and high-risk acute myocardial infarction. *Ann Intern Med*. 141:693–704.
- Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R, Collaboration PS. 2002. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *The Lancet*. 360:1903–1913.
- Lewis EJ, Hunsicker LG, Clarke WR, Berl T, Pohl MA, Lewis JB, Ritz E, Atkins RC, Rohde R, Raz I, Grp CS. 2001. Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 345:851–860.
- Li JS, Sharifi AM, Schiffrin EL. 1997. Effect of AT1 angiotensin-receptor blockade on structure and function of small arteries in SHR. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 30:75–83.
- Liao R, Podesser BK, Lim CC. 2012. The continuing evolution of the Langendorff and ejecting murine heart: new advances in cardiac phenotyping. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 303:H156–H167.
- Linz W, Schaper J, Wiemer G, Albus U. 1992. Ramipril prevents left ventricular hypertrophy with myocardial fibrosis without blood pressure reduction: a one year study in rats. *British journal of Pharmacology*. 107(4):970-5.
- Linz W, Wiemer G, Gohlke P, Unger T, Schölkens BA. 1995. Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Pharmacol Rev* ;47(1):25-49.
- Linz W, Wohlfart P, Schölkens BA, Malinski T, Wiemer G. 1999. Interactions among ACE, kinins and NO. *Cardiovasc Res*. 43:549–561.
- López-Sendón J, Swedberg K, McMurray J, Tamargo J, Maggioni AP, Dargie H, Tendera M, Waagstein F, Kjekshus J, Lechat P, Torp-Pedersen C, Task Force on ACE-inhibitors of the European Society of Cardiology. 2004. Expert consensus document on angiotensin converting enzyme inhibitors in cardiovascular disease. The Task Force on ACE-inhibitors of the European Society of Cardiology. In: Presented at the European heart journal. p. 1454–1470.
- Lutterotti von N, Catanzaro DF, Sealey JE, Laragh JH. 1994. Renin is not synthesized by cardiac and extrarenal vascular tissues. A review of experimental evidence. *Circulation*. 89:458–470.
- Macmahon S, Peto R, Cutler J, Collins R, Sorlie P, Neaton J, Abbott R, Godwin J, Dyer A, Stamler J. 1990. Blood-Pressure, Stroke, and Coronary Heart-Disease .1. Prolonged Differences in Blood-Pressure - Prospective Observational Studies Corrected for the

- Regression Dilution Bias. *The Lancet*. 335:765–774.
- Marks LS, Maxwell MH. 1979. Tigerstedt and the discovery of renin. An historical note., *Hypertension*.
- Mavani GP. 2015. A review of the nonpressor and nonantidiuretic actions of the hormone vasopressin. *Front Med*.
- Mazzolai L, Maillard M, Rossat J, Nussberger J, Brunner HR, Burnier M. 1999. Angiotensin II receptor blockade in normotensive subjects: A direct comparison of three AT1 receptor antagonists. *Hypertension*. 33:850–855.
- McMurray JJV, Krum H, Abraham WT, Dickstein K, Køber LV, Desai AS, Solomon SD, Greenlaw N, Ali MA, Chiang Y, Shao Q, Tarnesby G, Massie BM, ATMOSPHERE Committees Investigators. 2016. Aliskiren, Enalapril, or Aliskiren and Enalapril in Heart Failure. *N Engl J Med*. 374:1521–1532.
- McMurray JJV, Pitt B, Latini R, Maggioni AP, Solomon SD, Keefe DL, Ford J, Verma A, Lewsey J, Investigators FTAOOHFTA. 2008. Effects of the Oral Direct Renin Inhibitor Aliskiren in Patients With Symptomatic Heart Failure. *Circulation Heart Failure*.
- Miao J, Wang L, Zhang X, Zhu C, Cui L, Ji H, Liu Y, Wang X. 2016. Protective Effect of Aliskiren in Experimental Ischemic Stroke: Up-Regulated p-PI3K, p-AKT, Bcl-2 Expression, Attenuated Bax Expression. *Neurochem Res*. 41:2300–2310.
- Milenov K, Golenhofen K. 1983. Differentiated contractile responses of gastric smooth muscle to substance P. *Pflugers Arch*. 397:29–34.
- Miller C, Moczydlowski E, Latorre R, Phillips M. 1985. Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca²⁺-activated K⁺ channels from mammalian skeletal muscle. *Nature*. 313:316–318.
- Minasian SM, Galagudza MM, Dmitriev YV, Kurapeev DI, Vlasov TD. 2013. Myocardial protection against global ischemia with Krebs-Henseleit buffer-based cardioplegic solution. *J Cardiothorac Surg*. 8:60.
- Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR. 1976. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature*. 263:663–665.
- Morgan L, Broughton Pipkin F, Kalsheker N. 1996. Angiotensinogen: Molecular biology, biochemistry and physiology. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 28:1211–1222.
- Mukerji MS, Leathard HL, Huddart H. 2000. The effects of potassium channel blockers on progesterone-induced suppression of rat portal vein contractility. *J Pharm Pharmacol*. 52:983–990.
- Murphy TH, Alexander RW, Griendling KK, Runge MS, Bernstein KE. 1991. Isolation of a Cdna-Encoding the Vascular Type-1 Angiotensin-II Receptor. *Nature*. 351:233–236.
- Nakamura Y, Takemoto N, Kuroda H, Ohgi S. 1999. The advantages of normocalcemic continuous warm cardioplegia over low calcemic cardioplegia in myocardial protection. *Surg Today*. 29:884–889.
- Navalkar S, Parthasarathy S, Santanam N, Khan BV. 2001. Irbesartan, an angiotensin type 1 receptor inhibitor, regulates markers of inflammation in patients with premature atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 37:440–444.
- Nemenoff RA. 1998. Vasopressin signaling pathways in vascular smooth muscle. *Front*

Biosci.

- Newgreen DT, Bray KM, McHarg AD, Weston AH, Duty S, Brown BS, Kay PB, Edwards G, Longmore J, Southerton JS. 1990. The action of diazoxide and minoxidil sulphate on rat blood vessels: a comparison with cromakalim. *British Journal of Pharmacology*. 100:605–613.
- Nguyen G, Delarue F, Burcklé C, Bouzahir L, Giller T, Sraer J-D. 2002. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest*. 109:1417–1427.
- Nouet S, Nahmias C. 2000. Signal transduction from the angiotensin II AT2 receptor. *Trends Endocrinol Metab*. 11:1–6.
- O'Donnell SR, Wanstall JC. 1980. Evidence that ICI 118, 551 is a potent, highly beta2-selective adrenoceptor antagonist and can be used to characterize beta-adrenoceptor populations in tissues. *Life Sciences*.
- Oh B-H, Mitchell J, Herron JR, Chung J, Khan M, Keefe DL. 2007. Aliskiren, an Oral Renin Inhibitor, Provides Dose-Dependent Efficacy and Sustained 24-Hour Blood Pressure Control in Patients With Hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 49:1157–1163.
- Pagliari P, Penna C. 2005. Rethinking the Renin-Angiotensin System and Its Role in Cardiovascular Regulation. *Cardiovasc Drugs Ther*. 19:77–87.
- Parratt JR. 1967. Propranolol. *The Lancet*. 1:955–6.
- Parving H-H, Brenner BM, McMurray JJV, de Zeeuw D, Haffner SM, Solomon SD, Chaturvedi N, Persson F, Desai AS, Nicolaidis M, Richard A, Xiang Z, Brunel P, Pfeffer MA, ALTITUDE Investigators. 2012. Cardiorenal end points in a trial of aliskiren for type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 367:2204–2213.
- Paul M. 2006. Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems. *Physiological Reviews*. 86:747–803.
- Peters J, Farrenkopf R, Clausmeyer S, Zimmer J, Kantachuvesiri S, Sharp M, Mullins JJ. 2002. Functional significance of prorenin internalization in the rat heart. *Circulation Research*. 90:1135–1141.
- Pfeffer MA, Braunwald E, Moyé LA, Basta L, Brown EJ, Cuddy TE, Davis BR, Geltman EM, Goldman S, Flaker GC. 1992. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. *N Engl J Med*. 327:669–677.
- Pfeffer MA, Swedberg K, Granger CB, Held P, McMurray JJV, Michelson EL, Olofsson B, Ostergren J, Yusuf S, Pocock S, CHARM Investigators, Committees. 2003. Effects of candesartan on mortality and morbidity in patients with chronic heart failure: the CHARM-Overall programme. *Lancet*. 362:759–766.
- Phillips MI, de Oliveira EM. 2008. Brain renin angiotensin in disease. *J Mol Med*. 86:715–722.
- Pilz B, Shagdarsuren E, Wellner M, Fiebeler A, Dechend R, Gratz P, Meiners S, Feldman DL, Webb RL, Garrelds IM, Jan Danser AH, Luft FC, Muller DN. 2005. Aliskiren, a Human Renin Inhibitor, Ameliorates Cardiac and Renal Damage in Double-Transgenic Rats. *Hypertension*. 46:569–576.
- Piper I, Minshall E, Downing SJ, Hollingsworth M, Sadraei H. 1990. Effects of several potassium channel openers and glibenclamide on the uterus of the rat. *British Journal of*

- Pharmacology. 101:901–907.
- Pitt B. 1995. “Escape” of aldosterone production in patients with left ventricular dysfunction treated with an angiotensin converting enzyme inhibitor: implications for therapy. *Cardiovasc Drugs Ther.* 9:145–149.
- Pool JL, Schmieder RE, Azizi M, Aldigier J-C, Januszewicz A, Zidek W, Chiang Y, Satlin A. 2007. Aliskiren, an orally effective renin inhibitor, provides antihypertensive efficacy alone and in combination with valsartan. *American Journal of Hypertension.* 20:11–20.
- Povstyan OV, Gordienko DV, Harhun MI, Bolton TB. 2003. Identification of interstitial cells of Cajal in the rabbit portal vein. *Cell Calcium.* 33:223–239.
- Prescott G, Silversides DW, Chiu SML, Reudelhuber TL. 2000. Contribution of circulating renin to local synthesis of angiotensin peptides in the heart. *Physiological Genomics.* 4:67–73.
- Prichard BN, Gillam PMS. 1964. Use of Propranolol (Inderal) in Treatment of Hypertension. *Br Med J.* 2:725–6.
- Rahuel J, Rasetti V, Maibaum J, Rüeger H, Göschke R, Cohen NC, Stutz S, Cumin F, Fuhrer W, Wood JM, Grütter MG. 2000. Structure-based drug design: the discovery of novel nonpeptide orally active inhibitors of human renin. *Chem Biol.* 7:493–504.
- Rashikh A, Abul Kalam Najmi, Akhtar M, Mahmood D, Pillai KK, Ahmad SJ. 2011. Protective effects of aliskiren in doxorubicin-induced acute cardiomyopathy in rats. *Human & Experimental Toxicology.* 30:102–109.
- Rashikh A, Ahmad SJ, Pillai KK, Kohli K, Najmi AK. 2012. Aliskiren attenuates myocardial apoptosis and oxidative stress in chronic murine model of cardiomyopathy. *Biomed Pharmacother.* 66:138–143.
- Remuzzi G, Cattaneo D, Perico N. 2008. The Aggravating Mechanisms of Aldosterone on Kidney Fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology.* 19:1459–1462.
- Riet Te L, Van Esch JHM, Roks AJM, van den Meiracker AH, Danser AHJ. 2015. Hypertension: renin-angiotensin-aldosterone system alterations. *Circulation Research.* 116:960–975.
- Rizzoni D, Porteri E, Piccoli A, Castellano M, Bettoni G, Muiesan ML, Pasini G, Guelfi D, Mulvany MJ, Agabiti Rosei E. 1998. Effects of losartan and enalapril on small artery structure in hypertensive rats. *Hypertension.* 32:305–310.
- Rongen GA, Lenders JW, Smits P, Thien T. 1995. Clinical pharmacokinetics and efficacy of renin inhibitors. *Clin Pharmacokinet.* 29:6–14.
- Rosenthal J, Thurnreiter M, Plaschke M, Geyer M, Reiter W, Dahlheim H. 1990. Reninlike enzymes in human vasculature. *Hypertension.* 15:848–853.
- Rossi GP, Sacchetto A, Cesari M, Pessina AC. 1999. Interactions between endothelin-1 and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Cardiovasc Res.* 43:300–307.
- Rubin B, Antonaccio MJ, Horovitz ZP. 1978. Captopril (SQ 14,225) (D-3-mercaptopropanoyl-L-proline): a novel orally active inhibitor of angiotensin-converting enzyme and antihypertensive agent. *Prog Cardiovasc Dis.* 21:183–194.
- Sanders KM, Ward SM. 2006. Interstitial cells of Cajal: a new perspective on smooth muscle function. *The Journal of Physiology.* 576:721–726.
- Sanguinetti MC, Scott AL, Zingaro GJ, Siegl PK. 1988. BRL 34915 (cromakalim) activates ATP-sensitive K⁺ current in cardiac muscle. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85:8360–8364.

- Saris JJ, Derkx FHM, Lamers MJM, Saxena PR, Schalekamp MADH, Danser AHJ. 2001. Cardiomyocytes Bind and Activate Native Human Prorenin : Role of Soluble Mannose 6-Phosphate Receptors. *Hypertension*. 37:710–715.
- Saris JJ, van den Eijnden MMED, Lamers MJM, Saxena PR, Schalekamp MADH, Danser AHJ. 2002. Prorenin-Induced Myocyte Proliferation: No Role for Intracellular Angiotensin II. *Hypertension*. 39:573–577.
- Schiffrin EL. 1996. Correction of Remodeling and Function of Small Arteries in Human Hypertension by Cilazapril, an Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitor. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 27:13.
- Schiffrin EL. 2005. Vascular endothelin in hypertension. *Vascular Pharmacology*. 43:19–29.
- Schiffrin EL, Park JB, Intengan HD, Touyz RM. 2000. Correction of Arterial Structure and Endothelial Dysfunction in Human Essential Hypertension by the Angiotensin Receptor Antagonist Losartan. *Circulation*. 101:1653–1659.
- Schliep HJ, Harting J. 1984. [beta] 1-Selectivity of Bisoprolol, a New [beta]-Adrenoceptor Antagonist, in Anesthetized Dogs and Guinea Pigs. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*.
- Schmid-Antomarchi H, de Weille J, Fosset M. 1987. The antidiabetic sulfonylurea glibenclamide is a potent blocker of the ATP-modulated K⁺ channel in insulin secreting cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 146:21-5.
- Schmieder RE, Philipp T, Guerediaga J, Gorostidi M, Bush C, Keefe DL. 2009. Aliskiren-based therapy lowers blood pressure more effectively than hydrochlorothiazide-based therapy in obese patients with hypertension: sub-analysis of a 52-week, randomized, double-blind trial. *Journal of Hypertension*. 27:1493–1501.
- Schrier RW, Masoumi A, Elhassan E. 2010. Aldosterone: Role in Edematous Disorders, Hypertension, Chronic Renal Failure, and Metabolic Syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol*. 5:1132–1140.
- Schuijt MP, Basdew M, van Veghel R, de Vries R, Saxena PR, Schoemaker RG, Danser AH. 2001. AT(2) receptor-mediated vasodilation in the heart: effect of myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 281:H2590–H2596.
- Share L, Crofton JT. 1982. Contribution of vasopressin to hypertension. *Hypertension*. 4:III85–III92.
- Skeggs LT, Kahn JR, Lentz K, Shumway NP. 1957. The Preparation, Purification, and Amino Acid Sequence of a Polypeptide Renin Substrate. *J Exp Med*. 106:439–453.
- Smith C, Phillips M, Miller C. 1986. Purification of charybdotoxin, a specific inhibitor of the high-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel. *J Biol Chem*. 261:14607–14613.
- Solomon SD, Appelbaum E, Manning WJ, Verma A, Berglund T, Lukashevich V, Cherif Papst C, Smith BA, Dahlöf B, Aliskiren in Left Ventricular Hypertrophy (ALLAY) Trial Investigators. 2009. Effect of the direct Renin inhibitor aliskiren, the Angiotensin receptor blocker losartan, or both on left ventricular mass in patients with hypertension and left ventricular hypertrophy. *Circulation*. 119:530–537.
- SOLVD Investigators, Yusuf S, Pitt B, Davis CE, Hood WB, Cohn JN. 1992. Effect of enalapril on mortality and the development of heart failure in asymptomatic patients with reduced left ventricular ejection fractions. *N Engl J Med*. 327:685–691.
- Southerton JS, Weston AH, Bray KM, Newgreen DT, Taylor SG. 1988. The potassium channel opening action of pinacidil; studies using biochemical, ion flux and

- microelectrode techniques. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 338:310–318.
- Speth RC, Kim KH. 1990. Discrimination of two Angiotensin II Receptor Subtypes with a selective agonist analogue of Angiotensin II, p-Aminophenylalanine Angiotensin I. *Biochem Biophys Res Commun.* 169:997–1006.
- Staessen JA, Li Y, Richart T. 2006. Oral renin inhibitors. *Lancet.* 368:1449–1456.
- Stanton A, Jensen C, Nussberger J, O'Brien E. 2003. Blood Pressure Lowering in Essential Hypertension With an Oral Renin Inhibitor, Aliskiren. *Hypertension.* 42:1137–1143.
- Suarez-Kurtz G, Garcia ML, Kaczorowski GJ. 1991. Effects of charybdotoxin and iberiotoxin on the spontaneous motility and tonus of different guinea pig smooth muscle tissues. *J Pharmacol Exp Ther.* 259:439–443.
- Sutter MC. 1990. The mesenteric-portal vein in research. *Pharmacol Rev.* 42:287–325.
- Thibonnier M. 1992. Signal Transduction of V1-Vascular Vasopressin Receptors. *Regul Pept.* 38:1–11.
- Tigerstedt R, Bergman PG. 1898. Kidney and circulation. *Scand Arch Physiol.*
- Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JA, Smith RD. 1993. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev.* 45:205–251.
- Touyz RM, Schiffrin EL. 2000. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev.* 52:639–672.
- Tox U, Steffen H. 2006. Impact of Inhibitors of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System on Liver Fibrosis and Portal Hypertension. *CMC.* 13:3649–3661.
- Tsai C-F, Chen Y-C, Lin Y-K, Chen S-A, Chen Y-J. 2011. Electromechanical effects of the direct renin inhibitor (aliskiren) on the pulmonary vein and atrium. *Basic Research in Cardiology.* 106:979–993.
- Van Esch JHM, Gembardt F, Sterner-Kock A, Heringer-Walther S, Le TH, Lassner D, Stijnen T, Coffman TM, Schultheiss HP, Danser AHJ, Walther T. 2010. Cardiac phenotype and angiotensin II levels in AT1a, AT1b, and AT2 receptor single, double, and triple knockouts. *Cardiovasc Res.* 86:401–409.
- Van Kats JP, Danser AHJ, van Meegen JR, Sassen LMA, Verdouw PD, Schalekamp MADH. 1998. Angiotensin Production by the Heart: A Quantitative Study in Pigs With the Use of Radiolabeled Angiotensin Infusions. *Circulation.* 98:73–81.
- Van Kats J, Chai W, Duncker D, Schalekamp M, Danser A. 2005. Adrenal Angiotensin: Origin and Site of Generation. *American Journal of Hypertension.* 18:1104–1110.
- Van Kesteren CAM, Danser AHJ, Derkx FHM, Dekkers DHW, Lamers JMJ, Saxena PR, Schalekamp MADH. 1997. Mannose 6-Phosphate Receptor Mediated Internalization and Activation of Prorenin by Cardiac Cells. *Hypertension.* 30:1389–1396.
- Villarroel A, Alvarez O, Oberhauser A, Latorre R. 1988. Probing a Ca²⁺-activated K⁺ channel with quaternary ammonium ions. *Pflügers Archiv.*
- Virdis A, Ghiadoni L, Qasem AA, Lorenzini G, Duranti E, Cartoni G, Bruno RM, Bernini G, Taddei S. 2012. Effect of aliskiren treatment on endothelium-dependent vasodilation and aortic stiffness in essential hypertensive patients. *European Heart Journal.* 33:1530–1538.
- Voth D, Schipp R, Agsten M, Schurmann K, Kohlhardt M, Dudek J. 1969. The influence of

- the cation milieu and various drugs on the contractility and autorhythm of a spontaneous active smooth vascular muscle in vitro. *Archiv fur Kreislaufforschung*. 60(3):364–387.
- Walters PE, Gaspari TA, Widdop RE. 2005. Angiotensin-(1-7) Acts as a Vasodepressor Agent Via Angiotensin II Type 2 Receptors in Conscious Rats. *Hypertension*. 45:960–966.
- Warne T, Serrano-Vega MJ, Baker JG, Moukhametzianov R, Edwards PC, Henderson R, Leslie AGW, Tate CG, Schertler GFX. 2008. Structure of a β 1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature*. 454:486–491.
- Westermann D, Riad A, Lettau O, Roks A, Savvatis K, Becher PM, Escher F, Jan Danser AH, Schultheiss HP, Tschope C. 2008. Renin Inhibition Improves Cardiac Function and Remodeling After Myocardial Infarction Independent of Blood Pressure. *Hypertension*. 52:1068–1075.
- Wexler RR, Greenlee WJ, Irvin JD, Goldberg MR, Prendergast K, Smith RD, Timmermans PBMWM. 1996. Nonpeptide Angiotensin II Receptor Antagonists: The Next Generation in Antihypertensive Therapy. *J Med Chem*. 39:625–656.
- Whaley-Connell A, Habibi J, Cooper SA, DeMarco VG, Hayden MR, Stump CS, Link D, Ferrario CM, Sowers JR. 2008. Effect of renin inhibition and AT1R blockade on myocardial remodeling in the transgenic Ren2 rat. *AJP: Endocrinology and Metabolism*. 295:E103–E109.
- Whitebread S, Mele M, Kamber B, De Gasparo M. 1989. Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun*. 163:284–291.
- Winqvist RJ, Heaney LA, Wallace AA, Baskin EP, Stein RB, Garcia ML, Kaczorowski GJ. 1989. Glyburide blocks the relaxation response to BRL 34915 (cromakalim), minoxidil sulfate and diazoxide in vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther*. 248:149–156.
- Wood JM, Criscione L, De Gasparo M, Bühlmayer P, Rüeger H, Stanton JL, Jupp RA, Kay J. 1989. CGP 38 560: orally active, low-molecular-weight renin inhibitor with high potency and specificity. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 14:221–226.
- Wood JM, Maibaum J, Rahuel J, Grütter MG, Cohen NC, Rasetti V, Ruder H, Göschke R, Stutz S, Fuhrer W, Schilling W, Rigollier P, Yamaguchi Y, Cumin F, Baum HP, Schnell CR, Herold P, Mah R, Jensen C, O'Brien E, Stanton A, Bedigian MP. 2003. Structure-based design of aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun*. 308:698–705.
- Wood JM, Schnell CR, Cumin F, Menard J, Webb RL. 2005. Aliskiren, a novel, orally effective renin inhibitor, lowers blood pressure in marmosets and spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension*. 23:417–426.

8. ANHANG

8.1. ERGÄNZENDE MATERIALIEN ZUM HAUPTTEXT

Substanz	Dosierung	Frequenz [%]	Amplitude [%]	Stichprobe (n)
Glibenclamid	1 µmol/l	113,38 ± 3,85	90,10 ± 2,02	2
	3 µmol/l	137,18 ± 19,52	88,51 ± 5,72	
	10 µmol/l	178,81 ± 6,06	50,20 ± 19,21	
Dendrotoxin	0,1 nmol/l	92,31	75,20	1
	0,3 nmol/l	90,73	67,15	
	0,5 nmol/l	80,59	65,96	
Apamin	1 nmol/l	103,84	104,95	1
	3 nmol/l	125,99	101,34	
	5 nmol/l	123,22	108,84	
TEA	1 mmol/l	45,87	238,12	1
	3 mmol/l	33,33	325,77	
	10 mmol/l	30,33	349,19	
Charybdotoxin	0,1 nmol/l	97,93	108,08	1
	0,3 nmol/l	98,74	97,67	
	0,5 nmol/l	95,36	107,75	

Tabelle 1: Quantitative Daten der Charakteristika der untersuchten Kalium-Kanal-Antagonisten an der Portalvene

Parameter	Aliskirendosierung [µmol/l]	Mittelwert ([%])	Standardfehler (SEM)	Signifikanzniveau (p)	Signifikanzniveau, FDR-korrigiert
Perfusionsdruck	10	107,63	2,30	0,004	0,004
	30	124,55	4,47	<0,001	<0,001
	50	194,01	13,01	<0,001	<0,001
Herzfrequenz	10	82,90	3,23	0,002	0,004
	30	89,90	9,89	0,34	0,34
	50	70,77	4,06	<0,001	<0,001
LVP	10	120,25	14,41	0,20	0,40
	30	129,30	23,80	0,25	0,25
	50	155,95	23,68	0,05	0,15

Tabelle 2: Quantitative Daten zur dosisabhängigen Aliskiren-Wirkung am Langendorff-Herzen