

Die Auswirkung des Multikinase-Inhibitors Sorafenib in einem murinen in vivo Hypertrophiemodel

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Sebastian Osswald aus Duisburg

2010

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Priv. Doz. Dr. med. Georg Baumgarten

2. Gutachter: Professor Dr. med. Armin Welz

Tag der Mündlichen Prüfung: 15. April 2010

Aus dem Physiologischen Institut II der Universität Bonn
Direktor: Prof. Dr. med. P. Swandulla

FÜR P.

<i>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</i>	7
1. EINLEITUNG	8
1.1 PATHOGENESE DER HERZINSUFFIZIENZ.....	8
1.2 THERAPIE DER HERZINSUFFIZIENZ	11
1.4 SIGNALTRANSDUKTIONSWEG	14
1.5 KLINISCHE RELEVANZ	15
1.6 ZIEL DER ARBEIT	15
2. MATERIAL UND METHODEN	16
2.1 VERSUCHSTIERE UND HALTUNGSBEDINGUNGEN	16
2.2 VERSUCHSGRUPPEN	16
2.3 OPERATIONSTECHNIK	18
2.3.1 <i>Anästhesie</i>	18
2.3.2 <i>Intubation</i>	18
2.3.3 <i>Transversale aortale Konstriktion und Scheinoperation</i>	19
2.4 APPLIKATION VON SORAFENIB	22
2.5 HÄMODYNAMIK.....	23
2.6 BLUTENTNAHME	25
2.7 ORGANENTNAHME	25
2.8 VERMESSUNG DER TIBIA.....	25
2.9 GERÄTE UND MATERIALIEN	26
2.9.1 <i>Operationsmaterialien</i>	26
2.9.2 <i>Materialien zur Kathetermessung</i>	26
2.9.3 <i>Weitere Geräte und Materialien</i>	27
2.9.4 <i>Datenaufzeichnung und Statistik</i>	27
3. ERGEBNISSE	28
3.1 TIERZAHLEN UND MORTALITÄTSRATEN	28
3.2 HÄMODYNAMISCHE MESSDATEN.....	28
3.2.1 <i>Peripher (arteriell) gemessene Blutdrücke</i>	28
3.2.2 <i>Zentral gemessene Blutdrücke</i>	30
3.2.3 <i>Kontraktionsgeschwindigkeit, Relaxationsgeschwindigkeit und Frequenz</i>	33

3.3 KÖRPERMAßE	35
3.3.1 Herzgewichte	35
3.3.2 Körpergewicht	37
3.3.3 Gewicht des linken Ventrikels / Körpergewicht	38
4. DISKUSSION.....	41
5. AUSSICHTEN.....	46
6. ZUSAMMENFASSUNG	47
7. LITERATURVERZEICHNIS.....	49
DANKSAGUNG.....	59
LEBENS LAUF.....	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
DAD	diastolisch arterieller Druck
DLVD	diastolisch linksventrikulärer Druck
+ dp/dt max.	Kontraktionsgeschwindigkeit
- dp/dt min.	Relaxationsgeschwindigkeit
ERK	extracellular signal-regulated kinase
GHG	Gesamtherzgewicht
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LVG	linksventrikuläres Gewicht
MAD	mittlerer arterieller Druck
MAP	mitogen activated protein
MAPK	mitogen activated protein kinase
MEK	mitogen activated protein kinase
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MLVD	mittlerer linksventrikulärer Druck
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule, Maß für den Blutdruck
MW	Mittelwert
RVG	rechtsventrikuläres Gewicht
SAD	systolisch arterieller Druck
SEM	Standardabweichung
Sham	Scheinoperation
SLVD	systolisch linksventrikulärer Druck
SPM	Schläge pro Minute/Frequenz
TAC	transversale aortale Konstriktion
Tbl.	Tabelle
TL	Tibiallänge

1. Einleitung

1.1 Pathogenese der Herzinsuffizienz

Unter dem Begriff „Herzhypertrophie“ versteht man eine Größenzunahme des Herzmuskels. Nach der Ursache kann man zwischen idiopathischen, d.h. primären Hypertrophien ohne erkennbare Auslöser, und sekundären Hypertrophien mit bekannten Ursachen unterscheiden. Nach der Morphologie unterscheidet man zwischen einer konzentrischen und einer exzentrischen Hypertrophie.

Ursachen für die exzentrische, oder dilatative Hypertrophie, sind unter anderem eine familiäre Belastung, virale Infekte oder Alkoholabusus (Mestroni et al., 1999) sowie eine chronische Volumenbelastung durch z.B. eine Aortenklappeninsuffizienz. Hierbei kommt es sowohl zu einer Verdickung der Muskelschicht als auch zu einer Zunahme des Volumens der Kammer (Grossman et al., 1975, Gupta et al., 2007). Daraus folgt eine sog. systolische Funktionsstörung mit Abnahme der Auswurfleistung des Herzens. Bei der konzentrischen Hypertrophie kommt es durch eine erhöhte Druckbelastung des Ventrikels (z.B. durch Aortenklappenstenose oder arterielle Hypertonie) zu einer Zunahme der Wanddicke (Grossman et al., 1975), wobei der Durchmesser des Herzens weitestgehend gleich bleibt (Gupta et al., 2007), sich das Volumen der betroffenen Herzkammer jedoch verringert. Folge ist eine sog. diastolische Funktionsstörung bei der die Füllung des Ventrikels gestört ist. Die konzentrische Hypertrophie geht bei bleibender Druckbelastung in die exzentrische Form über (Schwartzkopff et al., 2000).

Pathophysiologisch erklärt sich die Herzvergrößerung unter anderem durch eine Zunahme des Zellvolumens der einzelnen Herzmuskelfaser, welche unter anderem auf einer Erhöhung der Proteinsynthese, Reorganisation des Zytoskeletts (Engelhardt und Merkle, 2006) sowie einer Zunahme von kontraktilen Elementen beruht (Mihl et al., 2008). Zudem kommt es durch die chronische Belastung des Herzens zu einer starken

Vermehrung von Fibroblasten (Wakatsuki et al., 2004) und einer Anhäufung von Kollagen (Pick et al., 1989).

Sorgt die Hypertrophie anfangs noch für eine Normalisierung der durch die erhöhte Druckbelastung angestiegenen Wandspannung im Ventrikel (Ricci et al., 2005) und erhält so die Auswurfleistung des Herzens aufrecht (Anselmi et al., 2008), dekompensiert das Herz mit zunehmender Dauer der Belastung und wird insuffizient (Takano et al., 2002).

Definiert ist die Herzinsuffizienz als Unvermögen des Herzens einen ausreichenden, für die Organperfusion nötigen, Blutdruck aufrecht zu erhalten (Spinarova und Vitovec, 2007).

Wesentliche Faktoren bei der Entstehung der Herzinsuffizienz sind einerseits die zunehmende Dilatation des Ventrikels (Van Empel et al., 2005) und andererseits der Verlust von Kardiomyozyten durch Apoptose (Olivetti et al., 1997). Ein entscheidender Mechanismus dabei ist die Aktivierung des autonomen sympathischen Nervensystems (Horwich und Middlekauff, 2008), welches über eine Erhöhung der Schlagkraft und der Frequenz des Herzens die Auswurfleistung des Ventrikels aufrecht erhalten soll (Spinarova und Vitovec, 2007). Als wichtigster Transmitter des sympathischen Systems zählt in erster Linie Noradrenalin, welches seine Wirkung über die Bindung primär an alpha-, aber auch über beta-Rezeptoren vermittelt (Singh et al., 2000).

Aufgrund einer Reduktion kardialer beta-Rezeptoren bei chronischer Stimulation des Sympathikus (Osadchii, 2007) und gesteigerter Konzentration von Katecholaminen kommt es in der Folge jedoch zu einer verminderten Ansprechbarkeit der Kardiomyozyten auf den sympathischen Reiz (Vatner et al., 1999). Zudem kann Noradrenalin selbst einen toxischen Effekt auf die Herzmuskelzellen ausüben und kann zum vermehrten Absterben der Zellen führen (Colucci et al., 2000). Daher verschlechtert sich mit zunehmendem Krankheitsverlauf die kardiale Pumpleistung weiter.

Einen weiteren Kompensationsmechanismus zur Aufrechterhaltung eines ausreichenden Blutdruckes stellt das Renin-Angiotensin-Aldosteron System dar, welches letztlich über eine vermehrte Natrium-Rückresorption in den distalen Nierentubuli zu einer Erhöhung des extrazellulären Flüssigkeitsvolumens führt. Das

damit verbundene Übermaß an Angiotensin II führt jedoch zu einer starken Vasokonstriktion (Adams, 2004) mit einhergehender erhöhter Nachlast am Herzen.

Zudem üben Angiotensin II und Aldosteron ihrerseits einen direkten fibrosierenden Effekt auf das Herz aus (Boccanelli und Battagliese, 2006, Johar et al., 2006). Eine weitere Verschlechterung der kardialen Situation ist die Folge.

Diesen gesamten Umbauprozess des Herzens, der letzten Endes in einer Herzinsuffizienz münden kann, fasst man unter dem Begriff "Remodeling" zusammen (Cohn et al., 2000).

Die Folgen der Herzinsuffizienz sind vielfältig. Durch die verminderte Pumpleistung kann die Versorgung der Organe mit Blut nicht mehr aufrechterhalten werden. Durch die diastolische Störung des linken Ventrikels kommt es zu einem Druckanstieg in der Lungenstrombahn mit Austritt von Flüssigkeit in das Lungengewebe – es bildet sich ein sog. Lungenödem, welches die Leistung der Lunge vermindert. Atemnot ist die Folge.

Eine der größten Gefahren jedoch geht von ventrikulären Herzrhythmusstörungen aus, in deren Folge die Patienten an einem plötzlichen Herztod versterben können.

Die Sterberate von Patienten mit einer Herzinsuffizienz Grad III-IV, nach der Einteilung der "New York Heart Association", liegt pro Jahr bei ca. 40 %. Die Hälfte dieser Patienten verstirbt am plötzlichen Herztod (Bigger, 1987). Es wird von einer mittleren Überlebensdauer bei dekompensierten Herzinsuffizienz bei Männern von 1,7 Jahren und bei Frauen von 3,2 Jahren berichtet. Die 1- bzw. 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei Männern bei 57 % bzw. 25 % und bei Frauen bei 64 % bzw. 38 % (Ho et al., 1993).

Auch eine Studie aus dem Jahr 1999 von Senni et al. zeigt, dass sich an den Überlebensraten nicht viel geändert hat. Hier wird von einer 1-Jahres-Überlebensrate von 72 bzw. 77 % und einer 5 Jahres-Überlebensrate von 34 bzw. 33 % nach Erstdiagnose einer dekompensierten Herzinsuffizienz berichtet. Auch hier zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Erkrankung ab dem 70. Lebensjahr (Senni et al., 1999).

1.2 Therapie der Herzinsuffizienz

Therapeutisch steht die Prävention der Entwicklung bzw. der Progression einer Herzinsuffizienz im Vordergrund. Dazu gehören in erster Linie die Reduktion von Risikofaktoren wie z.B. das optimale Einstellen einer arteriellen Hypertonie oder eines Diabetes mellitus, die konsequente und sofortige Behandlung eines Herzinfarktes oder die Therapie von Herzrhythmusstörungen.

Bei diagnostizierter chronischer Herzinsuffizienz sollte neben einer medikamentösen auch immer eine nicht-medikamentöse (supportive) Therapie erwogen werden. Hierzu gehören eine Normalisierung des Körpergewichtes, eine Verminderung der Kochsalz- und Flüssigkeitszufuhr sowie die Vermeidung von schädigenden Substanzen wie Nikotin und Alkohol.

Die medikamentöse Therapie erfolgt stadienabhängig, wobei eine der wichtigsten Substanzgruppen die ACE-Hemmer darstellen, da sie das kardiale Remodeling signifikant reduzieren (Chrysant und Nguyen, 2007) und damit die Überlebensrate verbessern. Zudem werden β -Blocker, welche ihre Wirkung über eine Senkung der Herzfrequenz und somit einem reduzierten Sauerstoffverbrauch der Kardiomyozyten ausüben, und Diuretika eingesetzt. Die Diuretika senken die Vor- und die Nachlast am Herzen und vermindern so die Volumen- bzw. Druckbelastung des Myokards.

Ab Stadium III können als weitere Ergänzung des Therapieregimes Aldosteron-Antagonisten eingesetzt werden (Hoppe et al., 2005).

Die Wirkung der ACE-Hemmer und der Aldosteron-Antagonisten beruht auf einer Verringerung des Aldosteronspiegels bzw. einer Blockade der Aldosteronrezeptoren wodurch das kardiale Remodeling verhindert wird (Taniguchi et al., 2006). Der Einfluss von Aldosteron auf die Umbauprozesse am Herzen beruht auf einer aldosteronabhängigen Erhöhung der Expression von inflammatorischen Stoffen, die durch erhöhte Kollagensynthese zur Fibrose des Herzmuskels führen (Brown, 2005, Wilke et al., 1996).

Eine andere Substanzgruppe stellen die Angiotensin II Rezeptorantagonisten (Sartane) dar, welche neben den ACE-Hemmern einen positiven Einfluss auf den Verlauf der Herzinsuffizienz gezeigt haben. Beide Substanzklassen vermindern Folgeschäden und

senken Mortalität sowie Morbität wobei die Sartane zumeist besser vertragen werden (Werner et al., 2008).

Mit Aliskiren ist seit 2007 der erste direkte Renininhibitor verfügbar. Das Mittel wirkt über eine enzymatische Hemmung durch Besetzung des aktiven Zentrums von Renin. Dadurch kommt es zu einer verringerten Synthese von Angiotensin I und II.

Bisherige Studien zeigten eine gute Verträglichkeit des Medikamentes sowohl als Monotherapie, als auch als Kombinationstherapie mit ACE-Hemmern oder AT-1-Rezeptorblockern. In wie weit sich das Medikament auf Lebensqualität und Überleben der Patienten auswirkt muß jedoch noch in weiteren Studien geklärt werden (Mahfoud et al., 2009).

Andere Untersuchungen haben gezeigt, dass es bei akuter und auch chronischer Herzinsuffizienz zu einer gesteigerten Produktion von Sauerstoffradikalen kommt (Ungvari et al., 2005). Ein Enzym, welches sich an der Bildung dieser Radikale beteiligt zeigte, ist die Xanthin-Oxidoreduktase. Sowohl in Tierversuchen als auch in einigen an Patienten durchgeführten Studien zeigte sich eine positive Beeinflussung bezüglich des Krankheitsverlaufes durch Hemmung der Xanthin-Oxidoreduktase (Boueiz et al., 2008), sodass hier sicherlich noch weitere Studien zu erwarten sind.

Durch immer detaillierteres Wissen um Zellvorgänge und physiologische, sowie pathologische Ablaufprozesse, zeigen sich auch zunehmend andere Wege auf, um neue Therapieoptionen zu entwickeln. Eine mögliche Option wurde von uns im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Es handelt sich um den Einfluß des Raf-Kinase-Inhibitors Sorafenib auf die Ausbildung der kardialen Hypertrophie.

1.3 Sorafenib

Sorafenib (Bay 43-9006) ist ein oral verfügbarer Multikinase-Inhibitor der Firma Bayer. Kinase-Inhibitoren sind Stoffe, die in der Lage sind, die Aktivität verschiedener Zell-Kinasen zu hemmen (Greil und Micksche, 2006). Kinasen wiederum sind Enzyme, die Energie in Form von Phosphatresten von z.B. ATP auf andere Substrate übertragen können.

Zunächst wurde der Wirkstoff als Hemmer der sog. Raf-Kinase entwickelt. In der Folge zeigte sich jedoch, dass die Substanz auch auf Tyrosinkinasen der Zelle (Hahn und

Stadler, 2006) sowie den VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor) einwirkt (Wilhelm et al., 2004).

Bei der Raf-Kinase handelt es sich um eine Seronin/Threonin Kinase des MAP-Kinase Signalweges ("mitogen activated protein kinase cascade") (Chong et al., 2003). Bei „Mitogenen“ handelt es sich um die Zelle beeinflussende, extrazelluläre Substanzen.

MAP-Kinasen haben Anteil an einer Vielzahl von Signalwegen in der Zelle (English und Cobb, 2002, Leicht et al., 2007) wobei es mit der ERK (extracellular-signal regulated protein kinase), der JNK (c-Jun N-terminal kinase) und der p38 Kinase drei verschiedene Untergruppen der MAP-Kinasen gibt (Wang et al., 1998), die jeweils auf unterschiedliche extrazelluläre Reize reagieren. Die ERK-Signalkaskade, deren Bestandteil die Raf-Kinase ist, vermittelt in erster Linie die Differenzierung und die Zellproliferation, die p38 und die JNK hingegen sind durch Stress aktivierte Kinasen, die das Absterben der Zelle vermitteln (Shan et al., 1999).

Sorafenib beeinflusst somit über die Inhibierung der Raf-Kinase die Transduktion extrazellulärer Signale über die RAF-MEK-ERK Signalkaskade in den Zellkern.

1.4 Signaltransduktionsweg

Initiiert wird die intrazelluläre Signalkaskade durch die Bindung eines Liganden, z.B. Wachstumsfaktoren, Zytokine oder Hormone, an einen extra- oder intrazellulären Rezeptor.

Dadurch werden sog. Ras-Proteine aktiviert, bei denen es sich um zellmembrangebundene G-Proteine handelt (Adjei, 2001), die ihrerseits die Raf-Kinase (MAPKK-Kinase, MAPKKK) aktivieren (Wellbrock et al., 2004). Nachfolgend werden in weiteren Schritten zunächst die MAPK/ERK Kinase (oder MEK, alternativ auch MAPK-Kinase) phosphoryliert und im Anschluß daran die „extracellular signal regulated kinase“ (oder ERK bzw. MAPK) durch Phosphorylierung aktiviert. Diese überträgt dann letztenendes durch Translokation (Campbell et al., 1998) das ankommende Signal in den Zellkern (Chong et al., 2003) (*Abbildung 1*). Hier werden daraufhin Transkriptionsfaktoren aktiviert (Campbell et al., 1998) die zur Expression entsprechender Genprodukte und damit zur Beantwortung des extrazellulären Signals führen (Hommes et al., 2003).

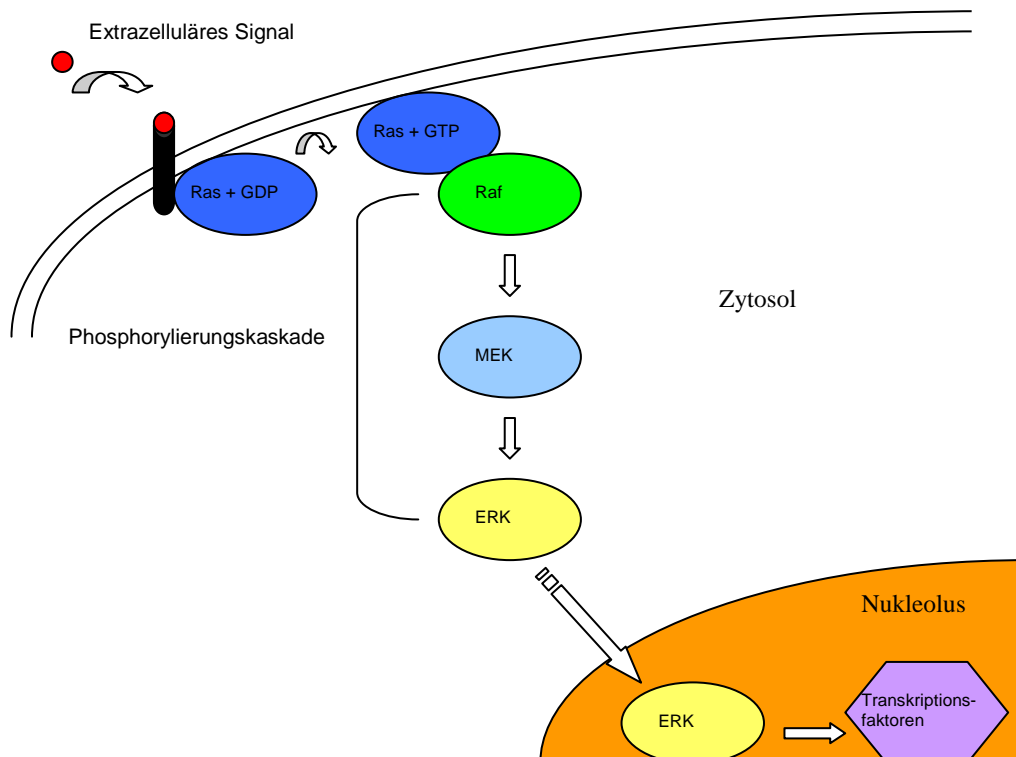


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Raf-Kinase Signalweges.

1.5 Klinische Relevanz

Aufgrund der Erkenntnis, dass Raf-Kinase Isoformen in einer ganzen Reihe von Tumoren überaktiv sind, so z.B. bei dem Nierenzellkarzinom, dem hepatozellulären Karzinom oder dem nicht kleinzelligen Bronchialkarzinom (Gollob et al., 2006), hat Sorafenib seine Anwendung in der Behandlung des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms bei Patienten, bei welchen eine Interferon-alfa oder eine Interleukin-2 basierte Therapie nicht angeschlagen hat, gefunden (sog. Second-line-therapie) (Strumberg und Martini, 2007). Hier zeigt der Wirkstoff durch Inhibition verschiedener Rezeptor-Tyrosin-Kinasen eine hemmende Wirkung auf die Tumorangio-genese und das Voranschreiten des Tumors (Adnane et al., 2006, Caraglia et al., 2006).

Zudem wird die Wirksamkeit in weiteren Studien bei nicht kleinzelligem Bronchialkarzinom oder dem hepatozellulären Karzinom (Liu et al., 2006) erprobt.

Aufgrund der oralen Verfügbarkeit und den zum einen geringen und zum anderen in der Regel vollständig reversiblen Nebenwirkungen, ist das Medikament sehr gut als Dauertherapeutikum anwendbar wobei die optimale Tagesdosis bei 2 x 400 mg zu liegen scheint (Strumberg et al., 2007, Strumberg und Martini, 2007).

1.6 Ziel der Arbeit

Gestützt auf die Erkenntnis, dass der MAP-Kinase Signalweg an der Entwicklung einer Herzmuskelhypertrophie beteiligt ist (Bueno und Molkentin, 2002, Takano et al., 2002), ist das Ziel dieser Arbeit den Einfluss des Multikinase Inhibitors Sorafenib auf die Ausbildung einer Herzhypertrophie zu untersuchen.

Getestet wurde das Medikament an einem, durch transverse aortale Konstriktion induzierten, murinen in vivo Hypertrophiemodell. Verglichen wurden die erhobenen Testergebnisse mit einer unbehandelten Kontrollgruppe.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Bei den für die Versuche verwendeten Tieren handelte es sich um männliche Mäuse der Inzuchtlinie C57/BL6 im Alter zwischen 12 und 14 Wochen und einem Körpergewicht zwischen 20 und 25 g. Die Tiere stammten aus der institutseigenen Zucht. Die ersten Zuchtpaare wurden bei Charles River erworben (Charles River GmbH, Sulzfeld, Deutschland).

Die Aufzucht sowie die Haltung der Tiere erfolgte unter Beachtung artgerechter, tierschutzrechtlicher und hygienischer Bedingungen unter Aufsicht eines Tierpflegers in transparenten 365 x 207 x 140 mm großen Polykarbonatkäfigen. Ausgelegt waren die Käfige mit Altromin Tierstreu Granulat. Wasser sowie Nahrung (Altromin- Standarddiät Maus - Ratte) standen den Tieren zur freien Verfügung. Aufbewahrt wurden die Käfige in einem Regalsystem, das durch ständige Klimatisierung für konstante Umweltbedingungen sorgte (Raumtemperatur 20-22°C und eine relative Luftfeuchtigkeit von 50%). Eine automatische Lichanlage sorgte für einen 12 Stunden Tag- und Nachtzyklus.

Genehmigt wurden die Tierversuche unter dem Tierversuchsantrag mit der Nummer 50.203.2-AC43 38/06.

2.2 Versuchsgruppen

Für die Versuche wurden vier Gruppen gebildet. In der Gruppe 1 und 2 wurden die Tiere einer transversen aortalen Konstriktion (TAC) (Kap. 2.3.3) unterzogen. In der Gruppe 3 und 4 wurden die Tiere (Kap. 2.3.3) scheinoperiert (Sham).

Die Tiere der Gruppen 1 und 3 wurden ab dem zweiten postoperativen Tag für 12 Tage transgastral mit dem Medikament Sorafenib versorgt. In den Gruppen 2 und 4 wurde

den Tieren im gleichen Zeitraum eine Trägersubstanz zu Kontrollzwecken verabreicht (Kap. 2.4).

Insgesamt 14 Tage nach der Operation wurden bei den Tieren wesentliche hämodynamische Parameter invasiv gemessen. Hierbei wurden unter anderem die peripheren und die zentralen Blutdrücke, die Herzfrequenz sowie die maximale Druckerhöhungs- und Abfallgeschwindigkeit bestimmt (*Abbildung 2*).

Am Ende der Untersuchung wurde den Mäusen unter fortlaufender Anästhesie Blut entnommen und das Herz entfernt, welches unter dem Mikroskop in rechten und linken Ventrikel getrennt wurde. Des Weiteren wurden die Leber sowie beide Nieren entfernt und die Länge der Tibia bestimmt.

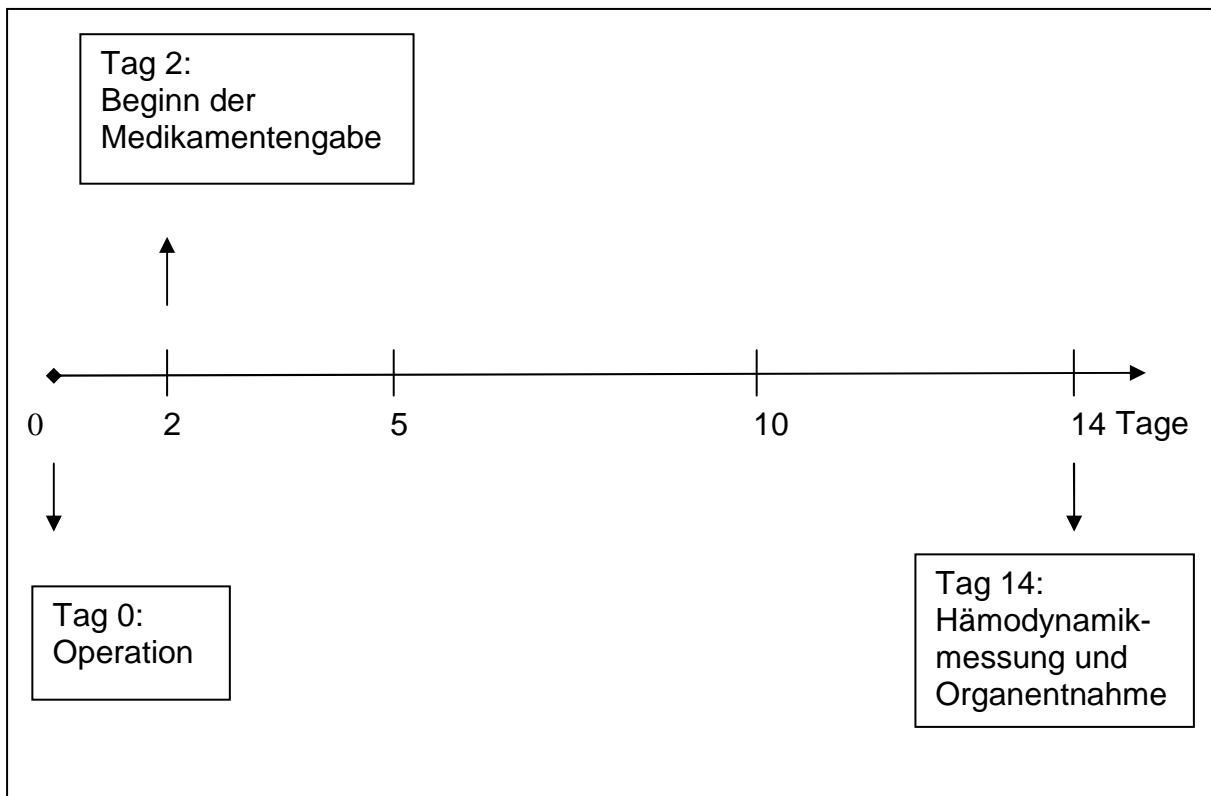


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung

Gruppe 1: TAC + Sorafenib

Gruppe 2: TAC + Kontrollsubstanz

Gruppe 3: Sham + Sorafenib

Gruppe 4: Sham + Kontrollsubstanz

2.3 Operationstechnik

2.3.1 Anästhesie

Zur initialen Betäubung wurden die Tiere in eine luftdichte Inhalationskammer gelegt, in welche ein Sauerstoff-Gasgemisch eingeleitet wurde (2 % Isofluran bei 2 l Sauerstoff/min). Anschließend wurden die Tiere auf einem beheizten Operationstisch gelagert und fixiert. Um ein vorzeitiges Aufwachen der Mäuse zu vermeiden, wurde die Narkose bis zur Intubation über eine Inhalationsmaske aufrechterhalten.

2.3.2 Intubation

Zur Intubation wurde nach Beseitigung der Haare im Operationsgebiet und anschließender Desinfektion (Betaisodona-Lösung) ein Hautschnitt vom Kinn bis auf Höhe des 3. Interkostalraumes parasternal durchgeführt.

Daraufhin wurden die beiden rechts und links direkt unterhalb der Haut gelegenen Speicheldrüsenlappen sowie die nun erscheinende und auf der Trachea liegende Muskulatur stumpf zur Seite präpariert, sodass die Trachea zum Vorschein kam.

Unter Sichtkontrolle und mittels eines Operationsmikroskopes wurde bei einer sechsfachen Vergrößerung zur Beatmung unter Narkose ein endotrachealer Tubus eingeführt (*Abbildung 3*). Die Narkose wurde mit einem Gasgemisch von 2% Isofluran und 1,5 l Sauerstoff/min aufrechterhalten. Das Beatmungsgerät wurde auf eine Atemfrequenz von 110 Atemzügen pro Minute und ein Atemzugvolumen von 200 µl eingestellt.

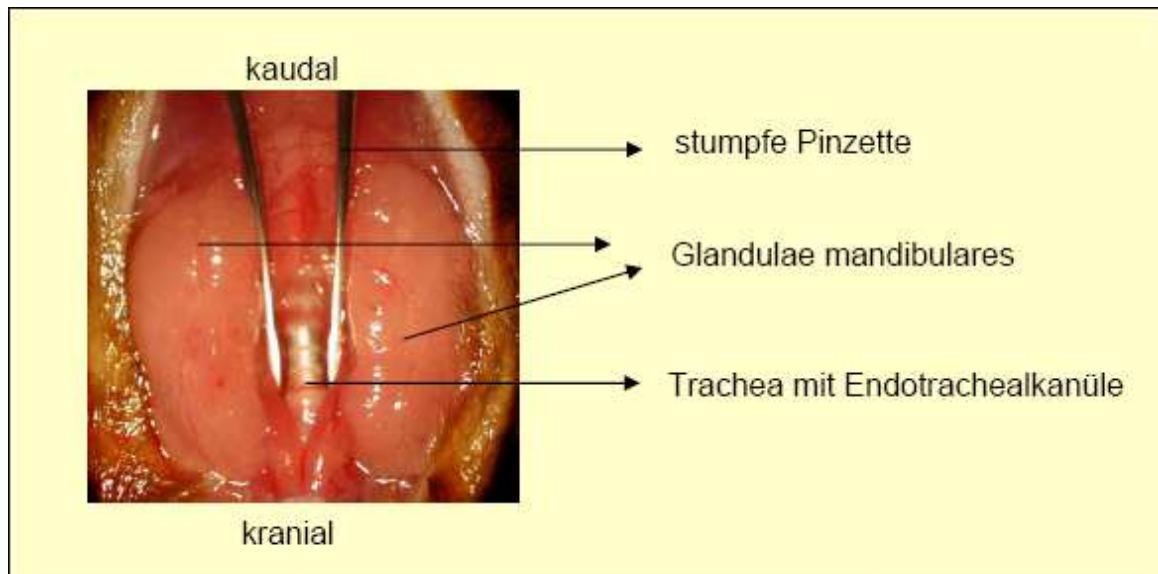


Abbildung 3: Operationssitus nach Intubation; in der Mitte die Trachea mit Tubus; seitlich die mittels einer stumpfen Pinzette zu Seite gehaltenen Speicheldrüsen und die Muskulatur.

2.3.3 Transversale aortale Konstriktion und Scheinoperation

Bei zwei der vier Gruppen wurde eine sogenannte TAC Operation nach Rockman et al. durchgeführt, welche zu einer Erhöhung des Widerstandes im Ausflusstraktes des linken Ventrikels führt und zunächst eine linksventrikuläre Hypertrophie induziert und erstmals im Jahr 1991 beschrieben wurde (Rockman et al., 1991).

Hierzu wurde nach der Intubation der Thorax parasternal von der ersten Rippe bis in den 3. Interkostalraum mit einer Schere aufgeschnitten. Die beiden Thoraxhälften wurden mit Hilfe zweier so genannter Retraktoren gespreizt, um das OP-Gebiet offen zu halten. Darunter liegend befindet sich der Thymus dessen beiden Lappen stumpf zur Seite präpariert und mit den Wundretractoren fixiert wurden.

Der Aortenbogen wurde zwischen dem Abgang des Truncus brachiocephalicus auf der rechten Seite und dem Abgang der A. carotis communis sinistra vom umliegenden Bindegewebe befreit.

Zur Konstriktion der Aorta wurde ein 2.0 Seidenfaden unter dem Aortenbogen hindurch gezogen, zwei gegenläufige Knoten vorbereitet und ein standardisierter Abstandshalter in Form einer auf ca. 2 mm verkürzten Kanüle der Größe G-27 zwischen das Gefäß und den Faden eingelegt. Daraufhin wurden die Knoten nacheinander zugezogen und

unmittelbar anschließend der Abstandhalter wieder entfernt (*Abbildung 4* und *Abbildung 5*). So wurde bei allen Tieren eine vergleichbare Verkleinerung des Lumens der Aorta um 70 % erreicht.

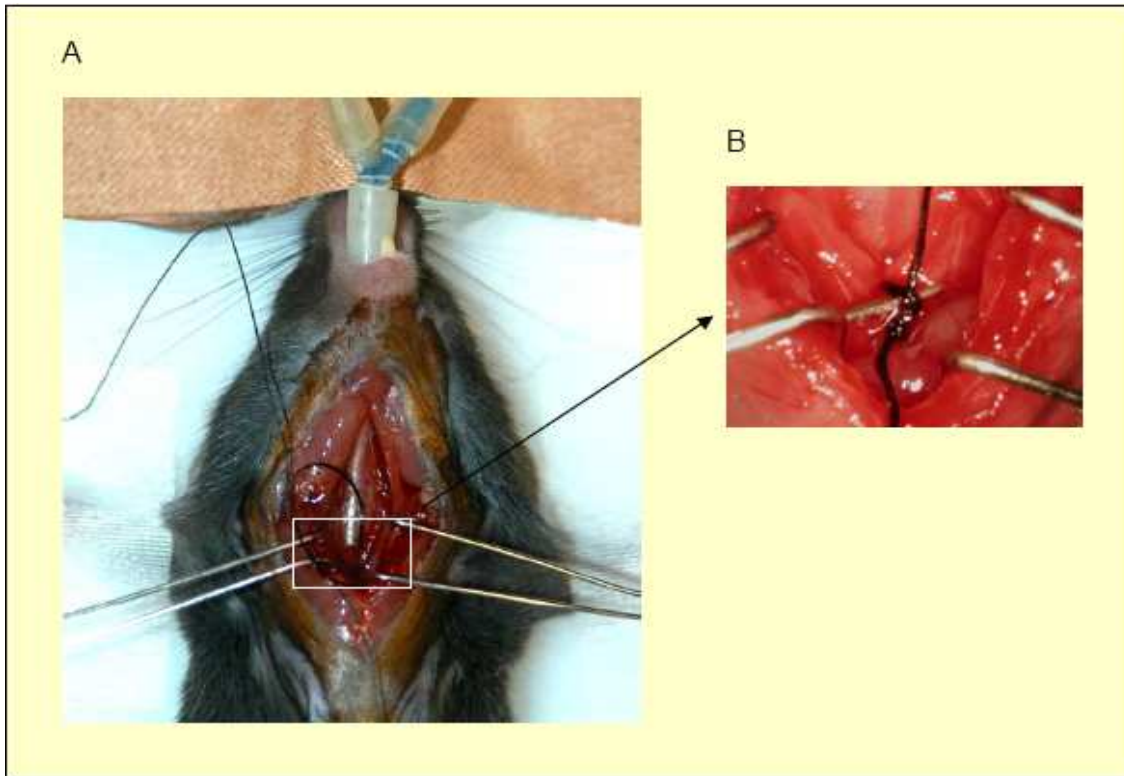


Abbildung 4: Intraoperative Aufnahme des OP-Situs

A: Retraktoren, Ligaturfäden und Trachea mit Tubus

B: Zu sehen sind der Aortenbogen mit umliegenden Ligaturfäden und den Knoten, dazwischen der Abstandhalter

Die Fadenenden wurden abgeschnitten, die Retraktoren entfernt, der Thymus wurde wieder zurück verlagert und der Thorax mit Einzelknopfnähten und einem nicht resorbierbaren monofilen Faden der Stärke 6.0 verschlossen.

Die Hautnaht erfolgte fortlaufend mit einem nicht resorbierbaren 5.0 monofilen Faden. Nach Verschluss des Operationsgebietes wurde dieses erneut desinfiziert. Die Extubation erfolgte nach einsetzender Spontanatmung.

Zur postoperativen analgetischen Therapie wurde den Versuchstieren nach Beendigung der Operation 0,075 mg Buprenorphin (Temgesic) intraperitoneal verabreicht.

Die gesamte Operation wurde unter einem Stereomikroskop (OpMi-191294 der Firma Zeiss) bei einer acht- bis sechzehnfachen Vergrößerung durchgeführt.

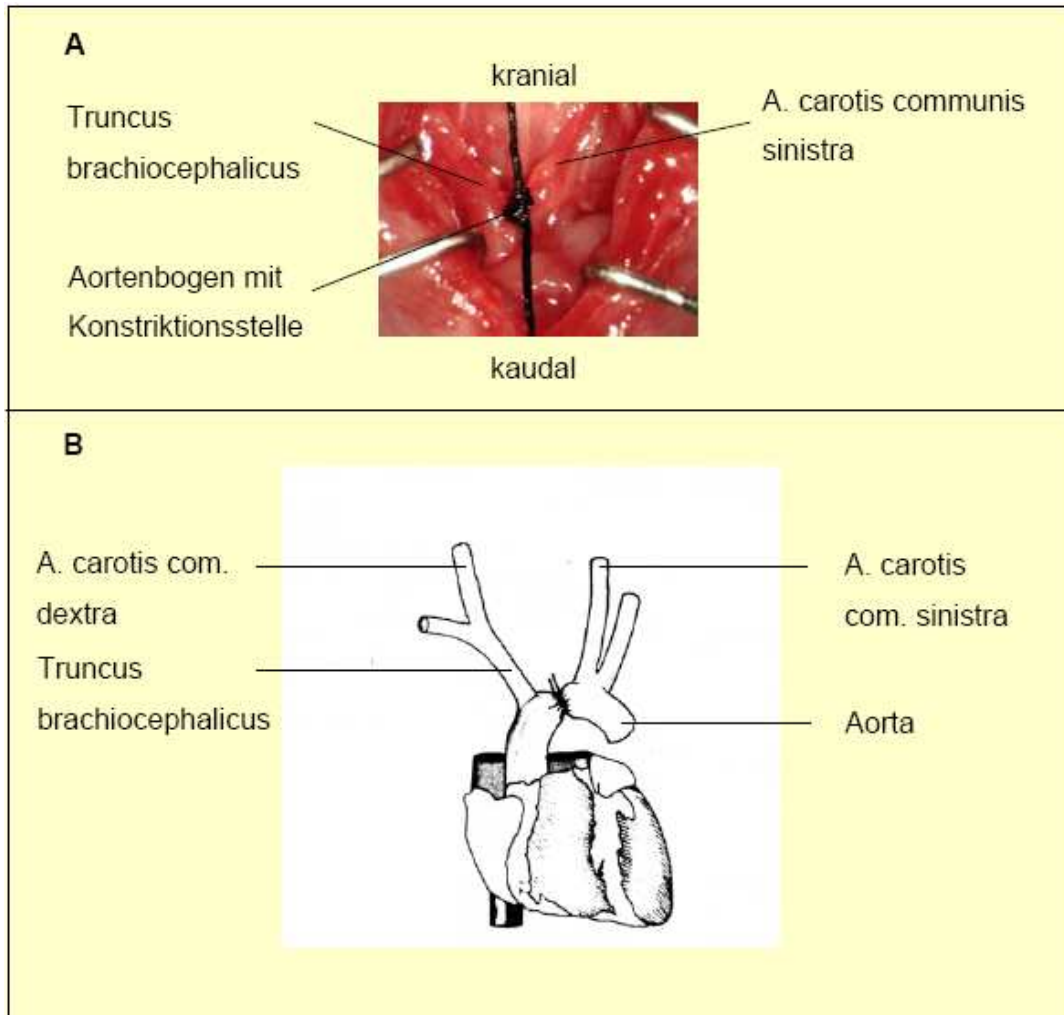


Abbildung 5: : Darstellung der TAC.

A: OP-Situs nach durchgeführter Konstriktion

B: Schemazeichnung der TAC mit Ligatur des Aortenbogens zwischen dem Abgang des Truncus brachiocephalicus und der A. carotis communis sinistra.

2.4 Applikation von Sorafenib

Um den Tieren die Möglichkeit zu geben, sich nach der Operation zu regenerieren und somit auch das Risiko von Wundheilungsstörungen zu senken, wurde mit der Applikation des Medikamentes erst mit dem zweiten postoperativen Tag begonnen. Den Tieren der Gruppen eins und drei wurde der Raf-Kinase Inhibitor Sorafenib von der Firma Bayer Schering Pharma appliziert.

Das Medikament wurde in Solutol HS 15[®], einem alkoholhaltigen Lösungsvermittler der Firma BASF gelöst und bei – 20° C in 1,5 ml fassenden Eppendorfgefäßen tief gefroren aufbewahrt. Dieses als Trägersubstanz dienende Mittel ermöglicht dem Körper schlecht wasserlösliche Wirkstoffe zu resorbieren (technische Information zu Solutol HS 15[®] von BASF).

Nach dem Auftauen wurde die Lösung mit 0,6 ml ca. 30° C warmem Wasser vermischt da die Substanz erst ab einer Temperatur von 30° C flüssig wird.

Die Dosierung des Medikamentes betrug 10 mg/kg KG. Die Tiere wurden täglich gewogen um sicher zu stellen, dass jedes der Tiere die richtige Dosis erhält. Appliziert wurde die Lösung per Magensonde. Hierzu wurde eine 1,2 mm im Querschnitt messende und 60 mm lange Stahlkanüle der Firma Acufirm (Ernst Kratz Nadelfabrik, Dreieich, Deutschland, Modell 1464LL) verwendet.

Den Mäusen der Gruppen 2 und 4 wurde zur Kontrolle lediglich die Trägersubstanz verabreicht.

Zur Applikation wurden die Tiere mit dem Zeigefinger und dem Daumen der linken Hand im Nacken gegriffen. Um Verletzungen zu vermeiden wurde zudem der Schwanz der Maus zwischen dem kleinen Finger und dem Daumenballen der Hand fixiert.

Dann wurde die Magensonde, die auf eine 1 ml Spritze aufgesetzt wurde, in den Ösophagus der Maus eingeführt, in den Magen vorgeschoben und die Substanz appliziert.

2.5 Hämodynamik

14 Tage nach erfolgreicher Operation wurde bei allen Tieren eine invasive Messung der hämodynamischen Parameter in der A. carotis communis dextra sowie der zentralen, linksventrikulären Werte durchgeführt. Hierzu wurde ein 1,4 French Millar-Katheter verwendet. Diese bei geschlossenem Thorax durchgeführte Messmethode wurde bereits mehrfach beschrieben (Baumgarten et al., 2006, Doevendans et al., 1998, Lorenz und Robbins, 1997). Die Tiere wurden durch eine Inhalationsnarkose betäubt (Kap. 3.1) und dann auf dem Operationstisch fixiert. Danach wurde ein Hautschnitt entlang der alten Operationsnarbe durchgeführt. Nachfolgend wurde die rechtsseitige A. carotis communis durch Freilegung der Muskulatur und der Speicheldrüse präpariert.

Unter Schonung des Nervus vagus wurde die Arterie von dem umliegenden Bindegewebe und der Vena jugularis befreit und drei vorbereitete Seidenfäden der Stärke 5/0 unter dem Gefäß hindurch gelegt.

Mittels des kranialen Fadens wurde das Gefäß abgebunden und durch einen Nadelhalter über den Faden leicht angespannt. Am kaudalen Faden wurde ebenfalls ein Nadelhalter befestigt der dazu diente, die Arterie leicht aufzuspannen und dadurch die Blutzufuhr zu unterbinden. Mit dem mittleren Faden wurde ein lockerer Knoten geknüpft und vorerst liegen gelassen.

Nun wurde mit einer Augenschere ein möglichst weit kranial gelegener Schnitt so durch den nun von der Blutzufuhr abgebundenen Gefäßabschnitt geführt, dass ein ausreichend großes Loch für den Millar-Katheter entstand, welcher mit dem mittleren Faden fixiert wurde. Der kaudale Faden wurde gelockert, um ein Verschieben des Katheters zu ermöglichen (*Abbildung 6 A und B*).

Zunächst wurde für 5 min. die peripheren Werte gemessen. Anschließend wurde die Messsonde in den linken Ventrikel vorgeschoben und es wurde ebenfalls für ca. 5 min eine Messung durchgeführt. Die Lagekontrolle erfolgte über die Beurteilung, respektive Veränderung des diastolischen Blutdrucks, welcher über das an den Katheter angeschlossene „Power lab data acquisition system“ analysiert wurde (ADInstruments, Unit 13, 22 Lexington Drive, Bella Vista, Australia).

Mit der dazugehörigen Software (Chart 5 for Windows®) wurden der systolische und der diastolische Blutdruck, die Herzfrequenz sowie die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit (als Maß für die Kontraktilität) und die maximale Druckabfallsgeschwindigkeit (als Maß für die Relaxation) gemessen. Nach Beendigung der Messung wurde der Katheter wieder entfernt.

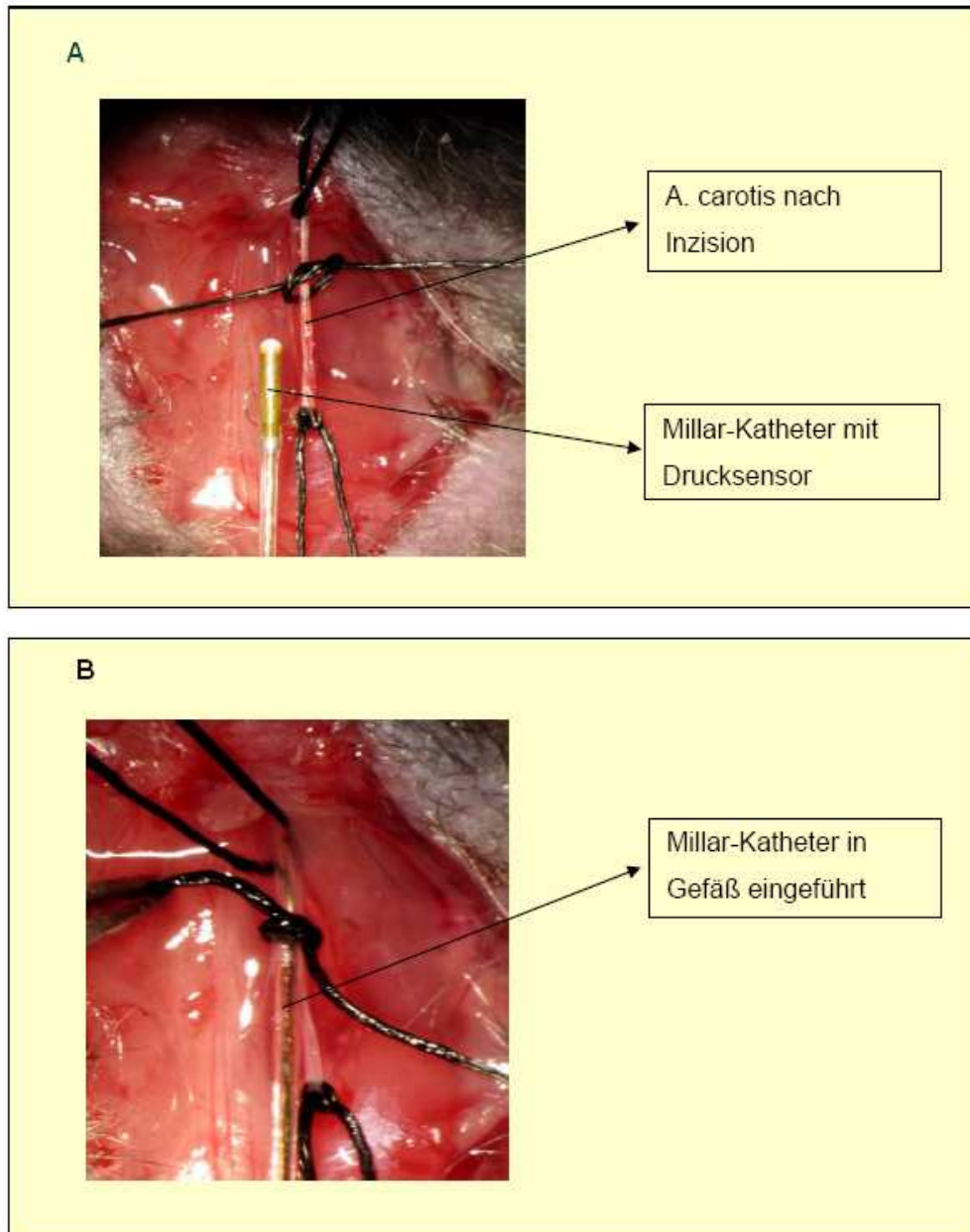


Abbildung 6: **A:** Spitze des Millar-Katheters neben der inzidierten A. carotis communis dextra
B: Eingeführter Katheter

2.6 Blutentnahme

Im Anschluss an die Messung wurde 1 ml Blut zur Gewinnung von Serum aus der zuvor für den Messkatheter eröffneten A. carotis dextra entnommen, was letztlich zum Versterben der Tiere führte.

Das Blut wurde in ein Eppendorfgefäß umgefüllt und für ca. 10 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei – 80°C tief gefroren.

2.7 Organentnahme

Im Anschluss an die Blutentnahme wurde den Versuchstieren die Organe Leber, Niere sowie das Herz entnommen. Das Herz wurde an der Herzbasis ab präpariert und unter dem Mikroskop in den linken und den rechten Ventrikel getrennt. Anschließend wurden die Ventrikel in Pufferlösung (PBS) gereinigt, nach Entfernung der Blutreste auf einer Feinwaage (Fa. Ohaus, Pinebrook, NJ USA) gewogen, um sie dann in beschrifteten Eppendorfgefäßen in flüssigem Stickstoff bei -196° C Schock zu gefrieren. Zur weiteren Verwendung wurden die Organe in einer Kühltruhe bei – 80°C aufbewahrt.

2.8 Vermessung der Tibia

Zuletzt wurde die Tibia des Tieres herauspräpariert und die Länge mittels einer Schieblehre (Fa. Mauser, St. Denis, Frankreich) bestimmt.

2.9 Geräte und Materialien

2.9.1 Operationsmaterialien

- Betaisodona Lösung, Mundipharma GmbH, Limburg
- Alkohol vergärt
- Isofluran: Forene[®], Abbot GmbH & Co. KG, Wiesbaden
- Endotrachealkanüle, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland
- Beatmungsgerät: Minivent, Typ 845, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
- Operationstisch: Eigenanfertigung der feinmechanischen Werkstatt des physiologischen Institutes 2 mit integriertem Wärmebad der Firma Rhema-Labortechnik, Hofheim
- Operationsmikroskop: OpMi-191294 der Firma Zeiss, Oberkochen
- Operationsbesteck: diverse Pinzetten, Scheren, Klemmen, Wundretractoren, Nadelhalter (Fine Science Tools Inc., San Francisco, CA, USA)
- Nahtmaterialien: 6/0 Prolene[®]- Fäden, 5/0 Prolene[®]-Fäden der Firma Ethicon, Johnson+Johnson Company, Norderstätt/Glashütte
- Seidenfaden: Seraflex[®] 2/0 der Firma Serag Wiessner, Naila

2.9.2 Materialien zur Kathetermessung

- Millar-Katheter: Mikro-Tip Pressure Katheter aus Nylon mit 1,4 French Drucksensor, ADInstruments GmbH, SpechbachPower Lab Data Acquisition System der Firma ADInstruments
- Software Chart 5 for Windows[®], ADInstruments

2.9.3 Weitere Geräte und Materialien

- Zentrifuge: Model 5415R, Eppendorf AG, Hamburg
- Schieblehre der Firma Mauser, St. Denis, Frankreich
- Feinwaage, Model Voyager, Ohaus, Giessen
- Magensonde, 1,2 x 60 mm, Modell 1464LL, Firma Acufirm, Dreieich
- 1 ml Spritzen
- Lösungsmittel Solutol HS 15[®] der Firma BASF, Ludwigshafen
- Raf-Kinase-Inhibitor Sorafenib (Nexavar[®]) der Firma Bayer HealthCare AG, Leverkusen
- Spüllösung PBS

2.9.4 Datenaufzeichnung und Statistik

Die mittels des Millar-Katheters gewonnenen Daten wurden mit dem Programm "Chart 5 for Windows[®]" der Firma ADInstruments aufgezeichnet. Aus den so gespeicherten Datensätzen wurde ein Zeitintervall von zwei Minuten ausgewählt und markiert. Für den markierten Bereich errechnete das Programm die Mittelwerte für Herzfrequenz, systolischen und diastolischen Blutdruck, die Kontraktions- sowie die Relaxationsgeschwindigkeit.

Zur statistischen Auswertung wurden die Daten in das Programm Prism[®], Version 4, der Firma GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA, übertragen und in allen Tiergruppen die Mittelwerte (MW) und Standardfehler (SEM) errechnet.

Um Unterschiede in den einzelnen Gruppen darzustellen wurde eine einfaktorielle Analyse (one-way ANOVA) sowie ein post hoc Test nach Bonferroni durchgeführt.

Als signifikant wurden Differenzen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ angesehen.

Die gewonnenen Werte wurden in Balkendiagrammen gegeneinander aufgetragen, wobei signifikante Unterschiede durch ungleiche Buchstaben gekennzeichnet wurden.

3. Ergebnisse

3.1 Tierzahlen und Mortalitätsraten

Für die Versuche wurden insgesamt 97 Tiere operiert. Davon starben 35 % (= 34 Tiere) an intra- bzw. unmittelbar postoperativ auftretenden Komplikationen vor allem zu Studienbeginn.

Von den 63 überlebenden Tieren starben weitere 25 % (= 16 Tiere) während der 14-tägigen Behandlung. Als Ursache kommen Herz-Kreislaufversagen bei zunehmender kardialer Dekompensation (bei TAC operierten Tieren) sowie Infektionen in Frage. Die Gesamtmortalitätsrate betrug 52 % (= 50 Tiere).

3.2 Hämodynamische Messdaten

3.2.1 Peripher (arteriell) gemessene Blutdrücke

Zwischen den Untersuchungsgruppen der TAC operierten Tiere und den Gruppen der scheinoperierten Tiere gibt es signifikante Unterschiede in den gemessenen Werten. Sowohl der systolische arterielle Blutdruck (SAD), als auch der mittlere arterielle Druck (MAD) sind bei den TAC-Mäusen signifikant höher als bei den Sham-Mäusen. Die diastolischen Werte (DAD) hingegen zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

Weder für SAD noch DAD oder MAD ergeben sich signifikante Unterschiede zwischen den mit dem Kinaseinhibitor stimulierten Tieren und der jeweiligen Kontrollgruppe (*Abbildung 7-Abbildung 9*).

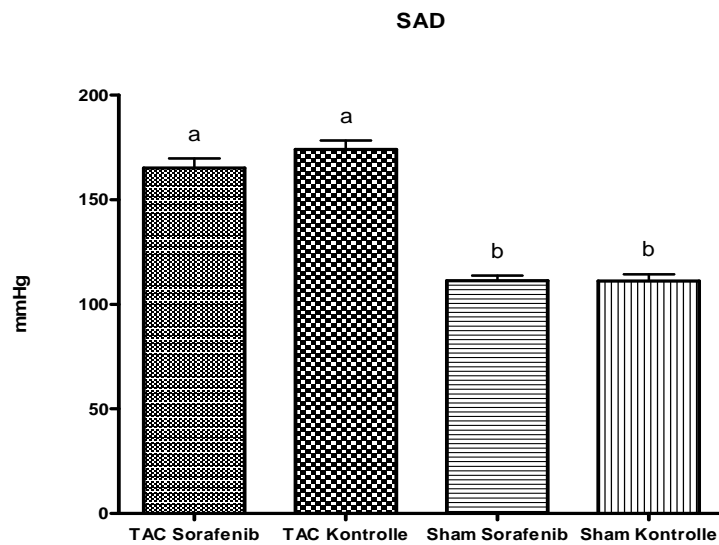


Abbildung 7: Dargestellt sind die peripher gemessenen systolisch arteriellen Blutdrücke (SAD) der TAC (transversale aortale Konstriktion) operierten Mäuse mit und ohne Sorafenib Applikation und den jeweiligen Sham operierten Kontrollgruppen in mmHg. Angabe von Mittelwert \pm Standardabweichung. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen werden durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.

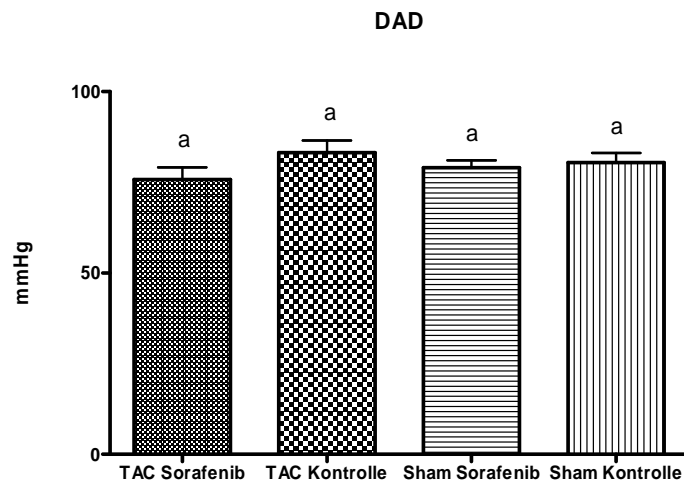


Abbildung 8: Dargestellt sind die peripher gemessenen diastolisch arteriellen Blutdrücke (DAD) der TAC (transversale aortale Konstriktion) operierten Mäuse mit und ohne Sorafenib Applikation und den jeweiligen Sham operierten Kontrollgruppen in mmHg. Angabe von Mittelwert \pm Standardabweichung. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen werden durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.

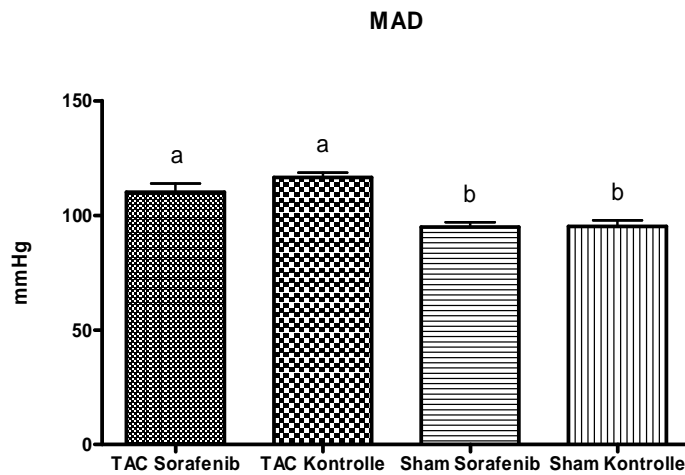


Abbildung 9: Dargestellt sind die arteriellen Mitteldrücke (MAD) der TAC (transversale aortale Konstriktion) operierten Mäuse mit und ohne Sorafenib Applikation und den jeweiligen Sham operierten Kontrollgruppen in mmHg. Angabe von Mittelwert \pm Standardabweichung. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen werden durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.

3.2.2 Zentral gemessene Blutdrücke

Gemessen wurden die Blutdrücke im linken Ventrikel als Maß für den zentralen Blutdruck.

Sowohl bei den systolisch aufgezeichneten Werten (SLVD), als auch bei den gemittelten Blutdruckwerten (MLVD) gibt es signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen der TAC operierten Tiere und den Gruppen der Sham-operierten Tiere.

Bei den mit Sorafenib behandelten Tieren und den jeweiligen Kontrollgruppen sowie der in der Diastole erhobenen Blutdruckdaten (DLVD) gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (*Abbildung 10 - Abbildung 12*).

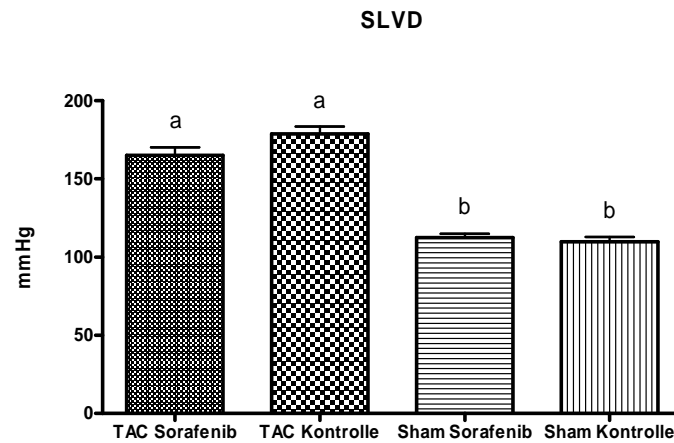


Abbildung 10: Dargestellt sind die linksventrikulären systolischen Blutdrücke (SLVD) der TAC (transversale aortale Konstriktion) operierten Mäuse mit und ohne Sorafenib Applikation und den jeweiligen Sham operierten Kontrollgruppen in mmHg. Angabe von Mittelwert \pm Standardabweichung. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen werden durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.

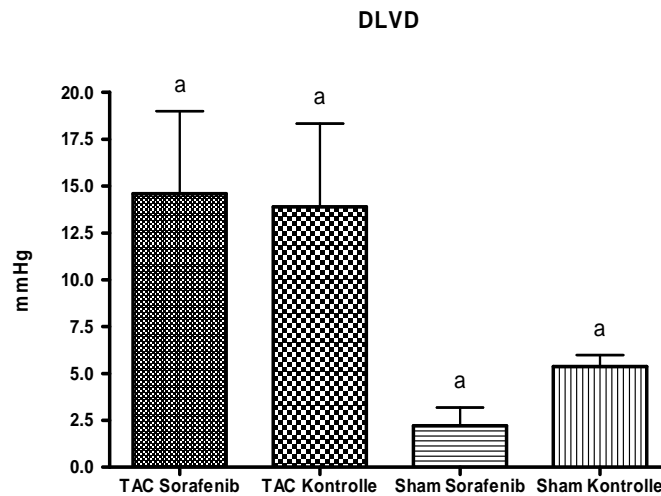


Abbildung 11: Dargestellt sind die diastolisch linksventrikulären Blutdruckwerte (DLVD) der TAC (transversale aortale Konstriktion) operierten Mäuse mit und ohne Sorafenib Applikation und den jeweiligen Sham operierten Kontrollgruppen in mmHg. Angabe von Mittelwert \pm Standardabweichung. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen werden durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.

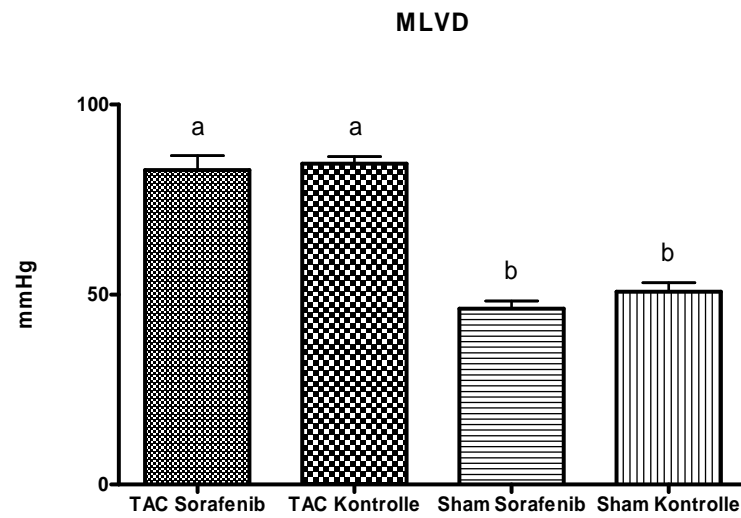


Abbildung 12: Dargestellt sind die arteriellen Mitteldrücke (MLVD) der TAC (transversale aortale Konstriktion) operierten Mäuse mit und ohne Sorafenib Applikation und den jeweiligen Sham operierten Kontrollgruppen in mmHg. Angabe von Mittelwert \pm Standardabweichung. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen werden durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.

3.2.3 Kontraktionsgeschwindigkeit, Relaxationsgeschwindigkeit und Frequenz

Bei der maximalen Druckerhöhungsgeschwindigkeit ($+dp/dt \text{ max}$), als Maß für die Kontraktionsgeschwindigkeit des Herzmuskels, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (*Abbildung 13*).

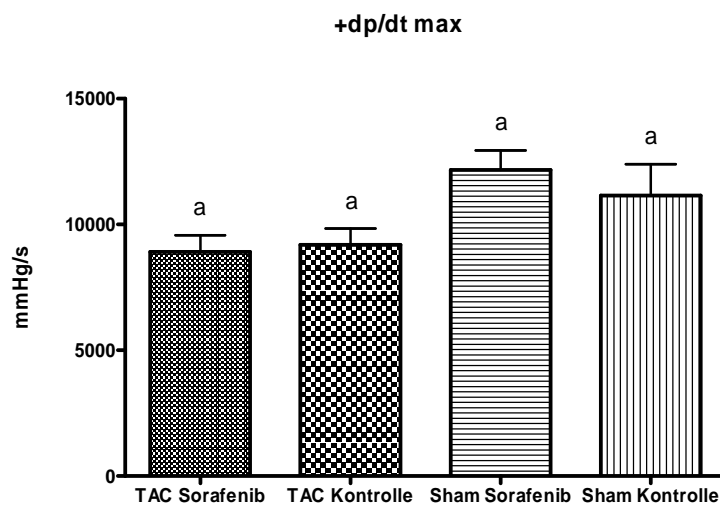


Abbildung 13: Dargestellt ist die maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit ($+dp/dt \text{ max}$) des linken Ventrikels der TAC (transversale aortale Konstriktion) operierten Mäuse mit und ohne Sorafenib Applikation und den jeweiligen Sham operierten Kontrollgruppen in mmHg/s. Angabe von Mittelwert \pm Standardabweichung. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen werden durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.

Bei der Messung der maximalen Druckabfallsgeschwindigkeit ($-dp/dt \text{ min}$), als Maß für die Relaxationsgeschwindigkeit des Herzmuskels, ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den Tieren der TAC-Gruppen und denen der mit Sorafenib behandelten Sham-Gruppe (*Abbildung 14*). Im Vergleich der anderen Gruppen miteinander traten keine Signifikanzen auf.

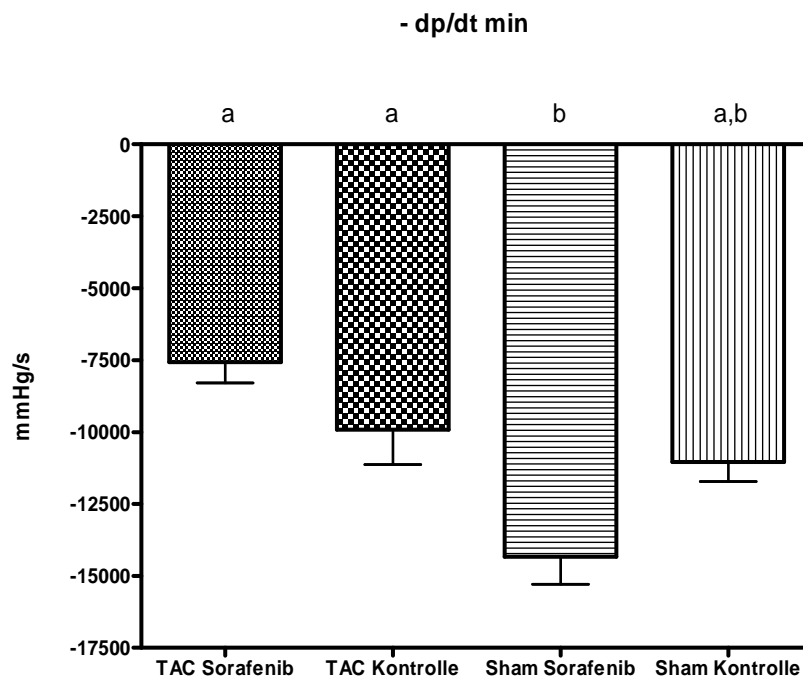


Abbildung 14: Dargestellt ist die maximale Druckabfallsgeschwindigkeit ($-dp/dt$ min) des linken Ventrikels der TAC (transversale aortale Konstriktion) operierten Mäuse mit und ohne Sorafenib Applikation und den jeweiligen Sham operierten Kontrollgruppen in mmHg. Angabe von Mittelwert \pm Standardabweichung. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen werden durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.

Vergleicht man die Herzfrequenz (SPM) der verschiedenen Versuchsgruppen untereinander ergibt sich nur zwischen der mit dem Multikinase-Inhibitor behandelten TAC-Gruppe und der Sham-Kontrollgruppe ein signifikanter Unterschied (*Abbildung 15*).

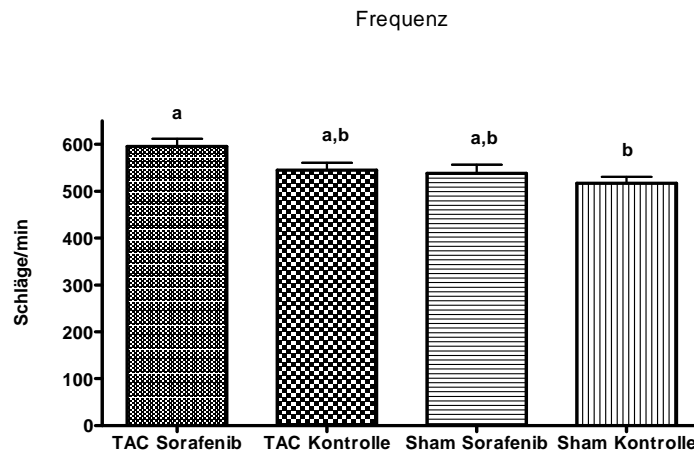


Abbildung 15: Abgebildet ist die Herzfrequenz pro Minute (SPM) der TAC (transversale aortale Konstriktion) operierten Mäuse mit und ohne Sorafenib Applikation und den jeweiligen Sham operierten Kontrollgruppen in mmHg. Angabe von Mittelwert \pm Standardabweichung. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen werden durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.

3.3 Körpermaße

3.3.1 Herzgewicht

Aufgetragen sind die Herzgewichte der einzelnen Gruppen. Die Herzen wurden unter dem Mikroskop in den linken (LVG) und rechten Ventrikel (RVG) getrennt und einzeln gewogen. Aus der Addition des Gewichtes des linken mit dem Gewicht des rechten Ventrikels ergab sich das Gesamtherzgewicht (GHG).

Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Sham- und den TAC-operierten Tieren bei der Gesamtherzmasse sowie bei der Masse des linken Ventrikels. Beim Gewicht des rechten Ventrikels ergab sich lediglich ein signifikanter Unterschied zwischen der TAC Kontrollgruppe und der Gruppe der Sham operierten und mit dem Kinaseinhibitor stimulierten Tiere (*Abbildung 16 - Abbildung 18*).

Keine signifikanten Unterschiede gibt es zwischen den mit Sorafenib behandelten Tieren sowie den jeweiligen Kontrollgruppen.

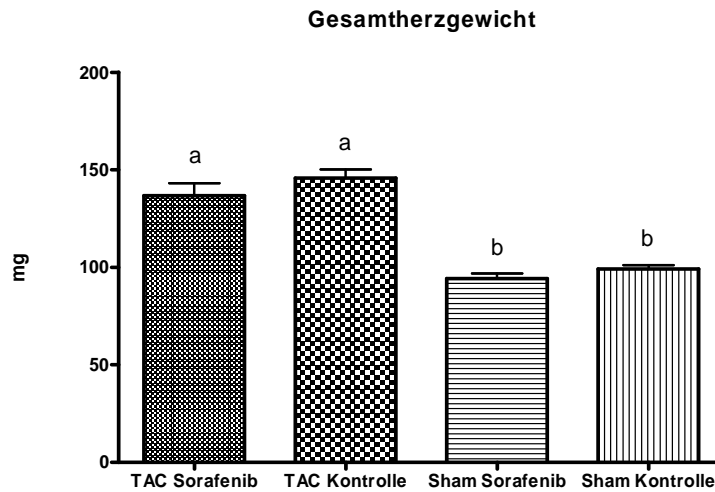


Abbildung 16: Dargestellt ist das Gesamtherzgewicht (GHG) der TAC (transversale aortale Konstriktion) operierten Mäuse mit und ohne Sorafenib Applikation und den jeweiligen Sham operierten Kontrollgruppen in mg. Angabe von Mittelwert \pm Standardabweichung. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen werden durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.

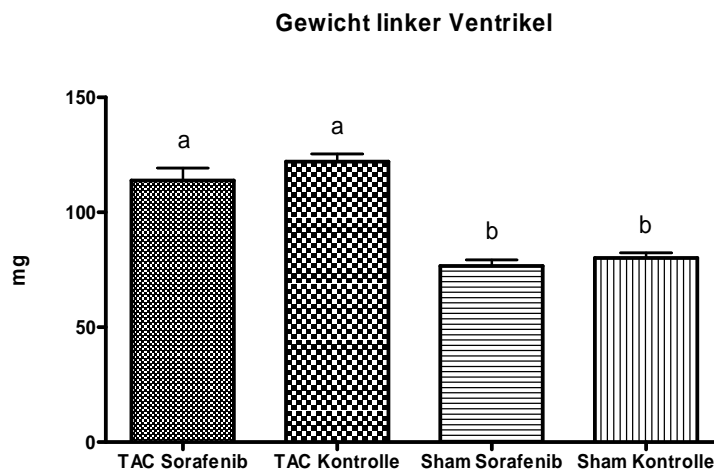


Abbildung 17: Dargestellt ist das linksventrikuläre Gewicht (LVG) der TAC (transversale aortale Konstriktion) operierten Mäuse mit und ohne Sorafenib Applikation und den jeweiligen Sham operierten Kontrollgruppen in mg. Angabe von Mittelwert \pm Standardabweichung. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen werden durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.

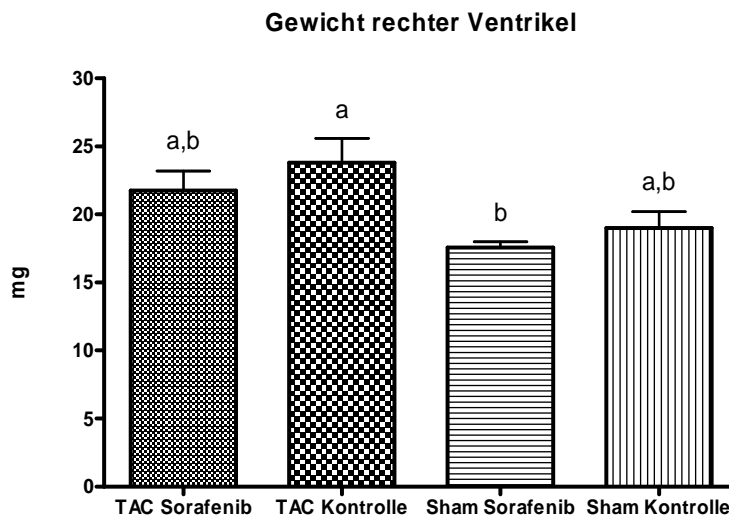


Abbildung 18: Dargestellt ist das rechtsventrikuläre Gewicht (RVG) der TAC (transversale aortale Konstriktion) operierten Mäuse mit und ohne Sorafenib Applikation und den jeweiligen Sham operierten Kontrollgruppen in mg. Angabe von Mittelwert \pm Standardabweichung. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen werden durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.

3.3.2 Körpergewicht

Als Hinweis auf eine in der Folge der Herzhypertrophie auftretenden Herzinsuffizienz, wurde ein Quotient aus dem Einzelgewicht der Mäuse vor und dem Gewicht 14 Tage nach der Operation gebildet. Ein Quotient > 1 deutet auf eine Gewichtszunahme hin. Ist der Quotient < 1 hat die Maus an Gewicht verloren.

Eine deutliche Zunahme des Gewichtes würde auf eine fortschreitende Insuffizienz der Pumpleistung des Herzens hindeuten, da eine Einschränkung der Pumpfunktion des linken Ventrikels, ausgelöst durch die TAC Operation, zu einem Anstieg des pulmonalen Blutdruckes führt. Der angestiegene pulmonale Blutdruck wiederum erhöht die Beanspruchung des rechten Ventrikels. Kann diese Mehrbelastung vom rechten Ventrikel nicht mehr geleistet werden, kommt es zu einem Rückstau des venösen Blutes in die Peripherie. Dadurch gelangt über den zunehmenden hydrostatischen Druck in den Venen vermehrt Flüssigkeit aus den Gefäßen in das umliegende Gewebe. Diese

Zunahme der extravasalen Flüssigkeitsmenge würde sich in einer Steigerung des Körpergewichtes (KG) dokumentieren lassen.

Bei der Auswertung der Daten ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (*Abbildung 19*). Das Durchschnittsgewicht der Tiere ist nach der Operation nahezu konstant geblieben.

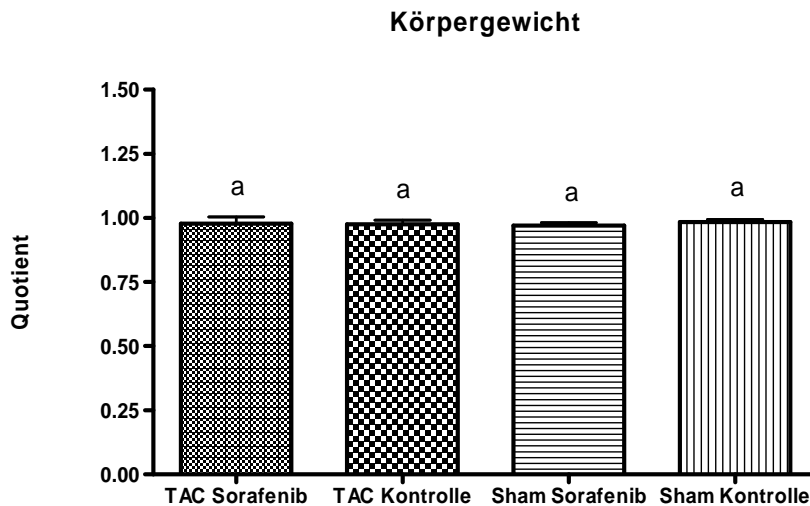


Abbildung 19: Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung der Quotienten gebildet aus dem Gewicht der Mäuse 14 Tage nach und dem Gewicht vor der Operation als Hinweis auf eine eingeschränkte kardiale Pumpleistung. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen werden durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.

3.3.3 Gewicht des linken Ventrikels / Körpergewicht

Um Unterschiede im Gewicht und der Körpergröße der einzelnen Mäuse und damit entstehenden Ungenauigkeiten in der Bestimmung der Zunahme der Herzmasse gerecht zu werden, wurden Quotienten gebildet.

Zum einen wurden das Körpergewicht (KG) und zum anderen die Länge der Tibia (TL) (als Maß für die Körpergröße) jeweils mit dem Gewicht des linken Ventrikels verglichen. Die entstehenden Quotienten wurden dann gegenüber gestellt.

Signifikante Unterschiede ergaben sich zwischen den Gruppen der Sham operierten Tiere und denen der TAC Gruppe. Zwischen den beiden Gruppen der TAC operierten

Mäuse und zwischen den Sham operierten Tieren ergeben sich keine signifikanten Unterschiede (*Abbildung 20*).

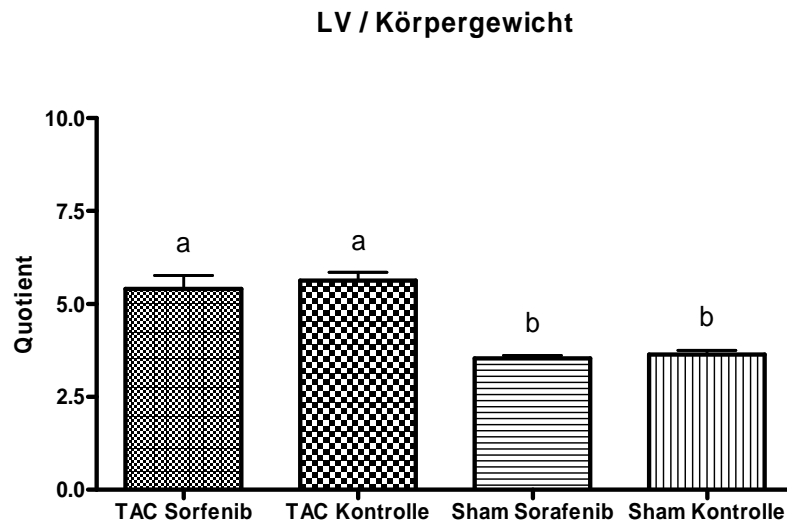


Abbildung 20: Gegenüber gestellt sind die Quotienten, die aus dem Gewicht des linken Ventrikels und des Körpergewichtes gebildet wurden. Angabe von Mittelwert \pm Standardabweichung. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen werden durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.

3.3.4 Gewicht des linken Ventrikels / Länge der Tibia

Signifikante Unterschiede ergaben sich zwischen den Tieren der TAC-Gruppe und denen der Sham-Gruppe (*Abbildung 21*). Darüber hinaus zeigten sich keine Signifikanzen.

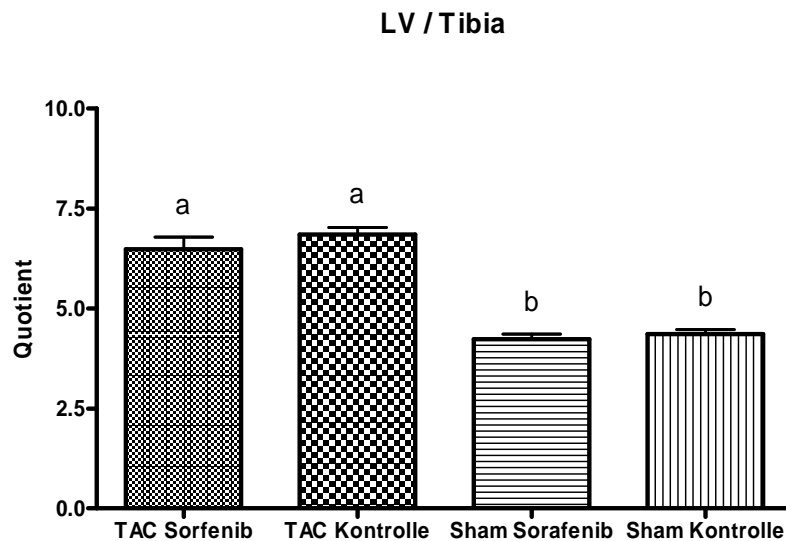


Abbildung 21: Dargestellt sind die Quotienten gebildet aus dem Gewicht des linken Ventrikels und der Länge der Tibia. Angabe in Mittelwert \pm Standardabweichung. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen werden durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.

4. Diskussion

Rockman et al. entwickelte die Methode der transversalen aortalen Konstriktion zur Induktion einer kardialen Hypertrophie in Folge einer linksventrikulären Hypertonie. Diese Methode ist in einer Vielzahl von Arbeitsgruppen zur Untersuchung der Pathogenese der kardialen Hypertrophie etabliert und akzeptiert (Loyer et al., 2008, Witt et al., 2008).

Im Laufe der letzten Jahrzehnte wurde eine Vielzahl von pathogenetisch relevanten Faktoren zur Entwicklung einer Hypertrophie untersucht und beschrieben. Hintergrund unserer Untersuchungen ist die von Esposito et. al beschriebene Beteiligung des MAP-Kinase Signalweges an der Ausbildung einer Herzmuskelvergrößerung (Esposito et al., 2001). Diese Beobachtung war bereits Grundlage für eine Vielzahl von Untersuchungen. Bueno et al. zeigten im Jahr 2000 an einem in vitro und in vivo transgenen Mausmodell, dass die MEK1-ERK1/2 Signalkaskade an der Ausbildung einer Herzmuskelhypertrophie beteiligt ist (Bueno et al., 2000). Zuvor waren es Bogoyevitch et al. 1993, die in ihren in vitro Versuchen an Herzmuskelzellen von Ratten eine Beteiligung des MAP-Kinase Signalweges an der Myokardhypertrophie vermuten ließen (Bogoyevitch et al., 1993).

Auch in einem aktuellen Beitrag von Gutkind und Offermans aus dem Jahr 2009 zeigt sich, dass der MAP-Kinase Signalweg noch immer Gegenstand zahlreicher Studien ist und immer noch nicht zur Gänze erklärt werden konnte (Gutkind und Offermans, 2009).

Vergleicht man nun zunächst die peripher gemessenen Blutdrücke miteinander, zeigen die gewonnenen Daten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen der mit Sorafenib behandelten Tiere und den jeweiligen Kontrollgruppen. Gleiche Verhältnisse stellen sich in den Daten der linksventrikulär erhobenen Werte dar, mit der Ausnahme, dass es in der Diastole zwischen keiner der Gruppen einen statistisch signifikanten Unterschied gibt.

In einer in vivo Studie von Moreno-Vinasco et al. zur Beeinflussung der pulmonalen Hypertonie zeigt sich nach einer Behandlung mit Sorafenib eine deutliche Senkung des pulmonalen Blutdruckes sowie ein eingeschränktes vaskuläres Remodeling (Moreno-

Vinasco et al., 2008). Die Vergleichbarkeit der Studienergebnisse miteinander ist, meiner Meinung nach, eingeschränkt, da die Untersuchungen an einem anderen Organ durchgeführt wurden. Auch die nachgewiesene direkte Beeinflussung des VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor) durch Sorafenib (Wilhelm et al., 2004) könnte nach meiner Ansicht in der angeführten Studie einen ausgeprägteren Effekt auf das dargestellte Ergebnis erklären, da der in unserer Versuchsreihe erzeugte Widerstand im Ausflusstrakt des linken Ventrikels nicht auf endotheliale Veränderungen der Aorta zurück zu führen ist, sondern durch eine mechanische Obstruktion bedingt wird.

Eine Studie von Klein et al. aus dem Jahr 2008 konnte ebenfalls einen günstigen Einfluss von Sorafenib auf die pulmonale Hypertonie nachweisen (Klein et al., 2008). Zudem konnte in dieser Versuchsreihe ein positiver Effekt auf das rechtsventrikuläre Remodeling durch Sorafenib nachgewiesen werden. Dieser Effekt beruhte auf der Unterdrückung des durch Vasopressin ausgelösten Remodelings.

Vasopressin (ADH- antidiuretisches Hormon) ist eine Substanz, die bei Patienten mit Bluthochdruck (Zhang et al., 1999) und bei Herzinsuffizienz (Chatterjee, 2005) vermehrt ausgeschüttet wird und seinerseits einen direkten Effekt auf die Ausbildung der kardialen Hypertrophie über die Aktivierung des MAPK-Signalweges hat (Yan-Ping et al., 2008).

Die Vergleichbarkeit mit unseren Daten ist jedoch nicht direkt möglich, da es sich bei der Verringerung des rechtsventrikulären Remodelings in vivo auch um einen sekundären Effekt durch die nachgewiesene Verbesserung der pulmonalen Hypertonie handeln könnte. Der in dieser Studie gezeigte direkte antihypertrophe Effekt wurde an einem Vasopressin induzierten in vitro Hypertrophiemodell erforscht und ist somit auch nicht direkt mit dem in meiner Arbeit verwendeten in vivo Modell vergleichbar.

Shevchuk et al. haben 1993 in ihrer Studie eine gestörte Relaxationsfähigkeit der Herzmuskelzellen bei fortgeschrittener Herzinsuffizienz nachgewiesen (Shevchuk et al., 1993). Daher wurde zur Beurteilung der Funktionalität der Kardiomyozyten hinsichtlich ihrer Kontraktilität die maximale Druckerhöhung- und die maximale Druckabfallgeschwindigkeit gemessen. Zudem wurde die Herzfrequenz aufgezeichnet. Eine Möglichkeit die Kontraktilität der Herzmuskelzellen unter physiologischen Voraussetzungen zu erhöhen ist durch den sog. Bowditch-Effekt beschrieben. Durch

Steigerung der Herzfrequenz steigt die Kontraktionskraft und die Relaxationsgeschwindigkeit und verbessert so die Auswurfleistung des Herzens (Varian und Janssen, 2007). Eine signifikante Erhöhung der Herzfrequenz als Hinweis auf eine kompensatorisch erhöhte Kontraktilität ergibt sich in dieser Arbeit allerdings nur zwischen der mit Sorafenib behandelten TAC-Gruppe und der Sham-Kontrollgruppe. Rückschlüsse lassen sich daraus nicht ableiten. Vergleicht man diese Ergebnisse mit anderen TAC basierten Studien zeigt sich, dass es auch dort keine erhöhten Herzfrequenzen im Vergleich zu den Kontrollgruppen gibt (Nakamura et al., 2001).

Bei der Messung der Druckanstiegsgeschwindigkeit im linken Ventrikel konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen nachgewiesen werden. Die gemessenen Werte für die Druckabfallsgeschwindigkeit als Maß für die Relaxationsgeschwindigkeit der Kardiomyozyten ergaben einen signifikanten Unterschied zwischen den TAC-Gruppen und der mit Sorafenib behandelten Sham-Gruppe. Eine Signifikanz zu der Kontrollgruppe der Sham operierten Mäuse lies sich nicht nachweisen. Tendenziell scheint aber sowohl die maximal Druckanstiegs- als auch die maximale Druckabfallsgeschwindigkeit in beiden TAC-Gruppen im Vergleich zu den Sham-Gruppen herabgesetzt. Diese Beobachtung könnte sich durch einen erhöhten kontraktile Grundtonus des Herzmuskels bei erhöhter Steifheit des myokardialen Gewebes nach Ausbildung einer kardialen Hypertrophie erklären lassen, wie es bereits zuvor durch Takano et al. in einer Studie aus dem Jahr 2002 beschrieben wurde (Takaoka et al., 2002).

Vergleicht man das mittlere Herzgewicht der einzelnen Gruppen miteinander ergeben sich sowohl für das Gesamtherzgewicht als auch für das Einzelgewicht des linken Ventrikels signifikante Unterschiede zwischen den TAC-operierten und den Sham-operierten Tieren. Dies ist eine Folge der TAC-Operation, nach welcher hauptsächlich der linke Ventrikel an Gewicht zunimmt. Das Maximum dieser Zunahme ist nach ca. 10 Tagen erreicht (Nakamura et al., 2001, Wagner et al., 2004). Auch bei der Masse des rechten Ventrikels ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der TAC-Kontrollgruppe und der Sham-Sorafenib-Gruppe welcher jedoch keine Bedeutung für die Interpretation dieser Forschungsarbeit hat.

Die Gewichtszunahme des Myokards unterschied sich zwischen der TAC-Kontroll- und der TAC-Sorafenib-Gruppe nicht signifikant. Es fiel allerdings auf, dass die TAC-

Sorafenib-Tiere gegenüber der Sham-Vergleichsgruppe lediglich eine 28,7%ige Zunahme des Gesamtherzgewichtes aufwiesen, während die Zunahme in der TAC-Kontrollgruppe bei 45% lag. Der fehlende statistische Nachweis könnte auf einen zu geringen Stichprobenumfang oder eine zu kurze Behandlungsdauer zurückzuführen sein. Auch eine zu niedrige Dosierung des Medikamentes könnte ein Grund für den ausbleibenden positiven Effekt auf die Hypertrophie sein.

Zur besseren Vergleichbarkeit der Daten mit anderen Studien und um den körperlichen Proportionen der Versuchstiere gerecht zu werden, wurden Quotienten zum einen aus dem Körpergewicht und zum anderen aus der Länge der Tibia im Vergleich mit dem linksventrikulären Gewicht gebildet. Die Vermessung der Tibia gleicht Ungenauigkeiten bezüglich des Ernährungszustandes der Tiere aus, da das Herzgewicht unter physiologischen Bedingungen mehr mit der Körpergröße als mit dem Körpergewicht korreliert.

Zudem wurde ein Quotient aus dem Körpergewicht der Versuchstiere vor der Operation und dem Gewicht nach zweiwöchiger Versuchsdauer in den einzelnen Gruppen gebildet. Eine Gewichtszunahme würde sich durch einen Wert > 1 darstellen lassen, hätten die Tiere an Gewicht verloren wäre der Wert < 1 .

Bei nahezu konstantem Gewichtsquotienten ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen. Dies deutet daraufhin, dass die Operation von den Tieren gut vertragen und auch die anschließende zweiwöchige Medikamentenapplikation von den Mäusen körperlich gut toleriert wurde.

Zudem könnte ein zunehmendes Körpergewicht in der Gruppe der TAC operierten Mäuse indirekt auf eine voranschreitende Herzinsuffizienz mit zunehmender Wasserretention hindeuten. Diesbezüglich stellten van den Bosch et al. und Arany et al. in ihren Forschungsarbeiten aus dem Jahr 2006 fest, das sich selbst 28 Wochen bzw. zwei Monate nach erfolgter TAC- Operation echokardiographisch noch keine Zeichen einer Dekompensation der Herzinsuffizienz nachweisen lassen (Arany et al., 2006, Van Den Bosch et al., 2006).

Somit ist nach einem zwei Wochen dauernden Intervall nicht mit einer Gewichtszunahme durch Verminderung der Herzleistung zu rechnen. Ein Rückschluss auf die Wirksamkeit von Sorafenib auf die kardiale Hypertrophie lässt sich daher hier nicht ableiten.

Wie im Vergleich mit anderen Forschungsarbeiten (Mirotsov et al., 2006, Van Den Bosch et al., 2006) zeigte sich eine signifikante Zunahme der gebildeten Quotienten nach TAC im Vergleich zur Sham Gruppe als Zeichen einer kompensatorischen kardialen Hypertrophie. Ein statistisch signifikanten Unterschied zwischen den mit dem Raf-Kinase-Inhibitor behandelten Tieren und der jeweiligen Kontrollgruppe lässt sich auch hier nicht nachweisen.

Somit lässt sich ein positiver Einfluss des Multikinase-Inhibitors Sorafenib auf die Entstehung einer kardialen Hypertrophie als kompensatorischer Anpassungsmechanismus des Herzens auf eine veränderte Volumen- oder Druckbelastung in dieser Arbeit nicht nachgewiesen. Allenfalls scheint sich tendenziell die Hypertrophie in den mit Sorafenib behandelten TAC Versuchsgruppen geringer auszuprägen. In Anlehnung an eine Studie von Liu et al. aus dem Jahr 2006 in der eine nachweisbare partielle Tumorreduktion des hepatozellulären Karzinoms bei einer täglichen Gabe von 100 mg/kg KG in 50 % der Versuchstiere nachzuweisen war (Liu et al., 2006), könnte eine höhere Dosierung des Medikamentes evtl. einen größeren Einfluss auf die Myokardhypertrophie haben. Auch die Behandlungsdauer könnte mit knapp zwei Wochen zu kurz gewählt sein um eine erkennbare signifikante Besserung herbeizuführen. Ob und wie weit eine Veränderung des Designs der Studie allerdings zu einer statistisch messbaren Verbesserung der Hypertrophie führt, ließ sich mit dieser Studie nicht klären.

Eine negative Beeinflussung der kardialen Leistung durch das Medikament konnte in dieser Studie nicht beobachtet werden.

5. Aussichten

Ob und wie weit Sorafenib eine Rolle in der Behandlung der kardialen Hypertrophie spielen wird, lässt sich anhand meiner Studienergebnisse nicht abschließend festlegen. Darüber hinaus gibt es aber weitere Ansätze in denen die Wirksamkeit von Sorafenib in anderen Erkrankungen, wie z.B. der pulmonalen Hypertonie (Moreno-Vinasco et al., 2008) oder Krebserkrankungen wie dem hepatozellulären Karzinom (Liu et al., 2006), getestet wird.

6. Zusammenfassung

Die Herzinsuffizienz, die unter anderem infolge einer Herzmuskelhypertrophie auftritt, ist eine der weltweit führenden Todesursachen und eine Behandlung dieser Erkrankung ist bis heute nur symptomatisch möglich.

In dieser Arbeit wurde die Auswirkung des Multikinase Inhibitors Sorafenib der Firma Bayer hinsichtlich seiner Wirkung auf die Entwicklung einer Herzmuskelhypertrophie getestet. Bei diesem Medikament handelt es sich um einen bei der Behandlung des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms eingesetzten Wirkstoff, der die sog. MAP-Kinase-Signalkaskade der Zelle blockiert. Dieser Signalweg ist an einer Vielzahl von Zellfunktionen beteiligt und sorgt für die Übertragung eines ankommenden extrazellulären Signals durch das Zytosol in den Zellkern. Vermittelt werden so unter anderem die Differenzierung, die Proliferation oder die Apoptose der Zelle.

Die Wirksamkeit der Substanz wurde an einem murinen in vivo Hypertrophiemodell getestet. Dazu wurde das Medikament Mäusen, die zuvor einer transversalen aortalen Konstriktion (TAC) zur Induzierung einer myokardialen Hypertrophie unterzogen wurden, in einer tägliche Dosis von 10 mg/kg KG mittels einer Magensonde verabreicht. Zudem wurde eine TAC-Kontrollgruppe und zwei Sham Gruppen gebildet. In diesen beiden Gruppen wurden die Tiere derselben Operation unterzogen, mit dem Unterschied, dass der Aortenbogen nicht ligiert wurde und somit keine Obstruktion im Ausflusstrakt des linken Ventrikels erzeugt wurde. Eine der Sham Gruppen wurde ebenfalls mit Sorafenib behandelt, die andere erhielt, ebenso wie die TAC-Kontrollgruppe, die für das Medikament notwendige Trägersubstanz zur Kontrolle. Verabreicht wurde das Medikament über einen Zeitraum von zwölf Tagen.

Nach diesem Zeitraum wurden die Tiere einer invasiven hämodynamischen Messung unterzogen. Dabei wurde über die rechte A. carotis interna eine Messsonde eingeführt mit welcher zunächst die peripheren und nach einem adäquaten Messintervall durch Verschieben der Sonde in den linken Ventrikel die zentralen hämodynamischen Daten aufgezeichnet wurden. Im Anschluss wurde den Tieren das Herz, die Leber und die Nieren entfernt und die Länge der Tibia bestimmt. Leber und Nieren wurden für evtl. folgende Untersuchungen tiefgefroren aufbewahrt. Das Herz wurde ohne die Vorhöfe in

den rechten und linken Ventrikel getrennt, einzeln gewogen und anschließend ebenfalls tiefgefroren.

Im Ergebnis konnte keine wesentliche, statistisch relevante Besserung der Hypertrophie durch das Medikament nachgewiesen werden. Auch auf den Blutdruck oder andere hämodynamische Parameter zeigten sich nach zwölf tägigem Behandlungsintervall keine signifikanten Auswirkungen.

Tendenziell erscheint indes die Hypertrophie nach der Applikation von Sorafenib geringer ausgeprägt zu sein als im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Bei fehlendem statistischen Nachweis dieser Beobachtung ist zu diskutieren, in wie weit ein verändertes Studiendesign hinsichtlich der Therapiedauer oder der zu applizierenden Dosis eine signifikante Änderung herbeiführen könnte.

7. Literaturverzeichnis

Adams Jr. KF. Pathophysiologic role of the renin-angiotensin-aldosterone and sympathetic nervous systems in heart failure. *Am. J. Health Syst. Pharm.* 2004; 61: 4-13.

Adjei AA. Ras signaling pathway proteins as therapeutic targets. *Curr. Pharm. Des.* 2001; 7: 1581-1594.

Adnane L, Trail PA, Taylor I, Wilhelm SM. Sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar), a dual-action inhibitor that targets RAF/MEK/ERK pathway in tumor cells and tyrosine kinases VEGFR/PDGFR in tumor vasculature. *Methods Enzymol.* 2006; 407: 597-612.

Anselmi A, Gaudino M, Baldi A, Vetrovec GW, Bussani R, Possati G, Abbate A. Role of apoptosis in pressure-overload cardiomyopathy. *J. Cardiovasc. Med. (Hagerstown).* 2008; 9: 227-232.

Arany Z, Novikov M, Chin S, Ma Y, Rosenzweig A, Spiegelman BM. Transverse aortic constriction leads to accelerated heart failure in mice lacking PPAR-gamma coactivator 1alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2006; 103: 10086-10091.

Baumgarten G, Kim SC, Stapel H, Vervolgyi V, Bittig A, Hoeft A, Meyer R, Grohe C, Knuefermann P. Myocardial injury modulates the innate immune system and changes myocardial sensitivity. *Basic Res. Cardiol.* 2006; 101: 427-435.

Bigger Jr. JT. Why patients with congestive heart failure die: arrhythmias and sudden cardiac death. *Circulation.* 1987; 75: 28-35.

Boccanelli A, Battagliese A. Effects of aldosterone receptor blocker therapy on cardiac remodeling. *G. Ital. Nefrol.* 2006; 23: 57-63.

Bogoyevitch MA, Glennon PE, Sugden PH. Endothelin-1, phorbol esters and phenylephrine stimulate MAP kinase activities in ventricular cardiomyocytes. *FEBS Lett.* 1993; 317: 271-275.

Boueiz A, Damarla M, Hassoun PM. Xanthine oxidoreductase in respiratory and cardiovascular disorders. *Am. J Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2008; 294: 830-840.

Brown NJ. Aldosterone and end-organ damage. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2005; 14: 235-241.

Bueno OF, De Windt LJ, Tymitz KM, Witt SA, Kimball TR, Klevitsky R, Hewett TE, Jones SP, Lefer DJ, Peng CF, Kitsis RN, Molkentin JD. The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *Embo. J.* 2000; 19: 6341-6350.

Bueno OF, Molkentin JD. Involvement of extracellular signal-regulated kinases 1/2 in cardiac hypertrophy and cell death. *Circ. Res.* 2002; 91: 776-781.

Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, Clark GJ, Der CJ. Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene.* 1998; 17: 1395-1413.

Caraglia M, Tassone P, Marra M, Budillon A, Venuta S, Tagliaferri P. Targeting Raf-kinase: molecular rationales and translational issues. *Ann. Oncol.* 2006; 17: 124-127.

Chatterjee K. Neurohormonal activation in congestive heart failure and the role of vasopressin. *Am. J. Cardiol.* 2005; 95: 8-13.

Chong H, Vikis HG, Guan KL. Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell. Signal.* 2003; 15: 463-469.

Chrysant GS, Nguyen PK. Moexipril and left ventricular hypertrophy. *Vasc. Health Risk Manag.* 2007; 3: 23-30.

Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2000; 35: 569-582.

Colucci WS, Sawyer DB, Singh K, Communal C. Adrenergic overload and apoptosis in heart failure: implications for therapy. *J. Card. Fail.* 2000; 6: 1-7.

Doevendans PA, Daemen MJ, de Muinck ED, Smits JF. Cardiovascular phenotyping in mice. *Cardiovasc. Res.* 1998; 39: 34-49.

Engelhardt S, Merkle S. Physiologisches und pathologisches Myokardwachstum?. *BIOspektrum* 2006; 12: 165-167.

English JM, Cobb MH. Pharmacological inhibitors of MAPK pathways. *Trends Pharmacol. Sci.* 2002; 23: 40-45.

Esposito G, Prasad SV, Rapacciuolo A, Mao L, Koch WJ, Rockman HA. Cardiac overexpression of a G(q) inhibitor blocks induction of extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH(2)-terminal kinase activity in in vivo pressure overload. *Circulation.* 2001; 103: 1453-1458.

Gollob JA, Wilhelm S, Carter C, Kelley SL. Role of Raf kinase in cancer: therapeutic potential of targeting the Raf/MEK/ERK signal transduction pathway. *Semin. Oncol.* 2006; 33: 392-406.

Greil R, Micksche M. Sorafenib. *ArzneimittelPROFIL.* 2006: 2-14.

Grossman W, Jones D, McLaurin LP. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J. Clin. Invest.* 1975; 56: 56-64.

Gupta S, Das B, Sen S. Cardiac Hypertrophy: Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING.* 2007; 9: 623-652.

Gutkind JS, Offermanns S. A new G(q)-initiated MAPK signaling pathway in the heart. *Dev. Cell.* 2009; 16: 163-164.

Hahn O, Stadler W. Sorafenib. *Curr. Opin. Oncol.* 2006; 18: 615-621.

Ho KK, Anderson KM, Kannel WB, Grossman W, Levy D. Survival after the onset of congestive heart failure in Framingham Heart Study subjects. *Circulation.* 1993; 88: 107-115.

Hommes DW, Peppelenbosch MP, van Deventer SJ. Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets. *Gut.* 2003; 52: 144-151.

Hoppe UC, Böhm M, Dietz R, Hanrath P, Kroemer HK, Osterspey A, Schmaltz AA, Erdmann E. Leitlinien zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz. *Z. Kardiol.* 2005; 94: 488-509.

Horwich TB, Middlekauff HR. Potential autonomic nervous system effects of statins in heart failure. *Heart Fail. Clin.* 2008; 4: 163-170.

Johar S, Cave AC, Narayanapanicker A, Grieve DJ, Shah AM. Aldosterone mediates angiotensin II-induced interstitial cardiac fibrosis via a Nox2-containing NADPH oxidase. *Faseb J.* 2006; 20: 1546-1548.

Klein M, Schermuly RT, Ellinghaus P, Milting H, Riedl B, Nikolova S, Pullamsetti SS, Weissmann N, Dony E, Savai R, Ghofrani HA, Grimminger F, Busch AE, Schafer S. Combined tyrosine and serine/threonine kinase inhibition by sorafenib prevents progression of experimental pulmonary hypertension and myocardial remodeling. *Circulation.* 2008; 118: 2081-2090.

Leicht DT, Balan V, Kaplun A, Singh-Gupta V, Kaplun L, Dobson M, Tzivion G. Raf kinases: function, regulation and role in human cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* 2007; 1773: 1196-1212.

Liu L, Cao Y, Chen C, Zhang X, McNabola A, Wilkie D, Wilhelm S, Lynch M, Carter C. Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Res.* 2006; 66: 11851-11858.

Lorenz JN, Robbins J. Measurement of intraventricular pressure and cardiac performance in the intact closed-chest anesthetized mouse. *Am. J. Physiol.* 1997; 272: 1137-1146.

Loyer X, Gomez AM, Milliez P, Fernandez-Velasco M, Vangheluwe P, Vinet L, Charue D, Vaudin E, Zhang W, Sainte-Marie Y, Robidel E, Marty I, Mayer B, Jaisser F, Mercadier JJ, Richard S, Shah AM, Benitah JP, Samuel JL, Heymes C. Cardiomyocyte overexpression of neuronal nitric oxide synthase delays transition toward heart failure in response to pressure overload by preserving calcium cycling. *Circulation.* 2008; 117: 3187-3198.

Mahfoud F, Ukena C, Bohm M. Direct renin inhibition: a new and promising treatment principle in heart failure? *Dtsch. Med. Wochenschr.* 2009; 134: 759-762.

Mestroni L, Maisch B, McKenna WJ, Schwartz K, Charron P, Rocco C, Tesson F, Richter A, Wilke A, Komajda M. Guidelines for the study of familial dilated cardiomyopathies. Collaborative Research Group of the European Human and Capital Mobility Project on Familial Dilated Cardiomyopathy. *Eur. Heart. J.* 1999; 20: 93-102.

Mihl C, Dassen WR, Kuipers H. Cardiac remodelling: concentric versus eccentric hypertrophy in strength and endurance athletes. *Neth. Heart J.* 2008; 16: 129-133.

Mirotsou M, Dzau VJ, Pratt RE, Weinberg EO. Physiological genomics of cardiac disease: quantitative relationships between gene expression and left ventricular hypertrophy. *Physiol. Genomics.* 2006; 27: 86-94.

Moreno-Vinasco L, Gomberg-Maitland M, Maitland ML, Desai AA, Singleton PA, Sammani S, Sam L, Liu Y, Husain AN, Lang RM, Ratain MJ, Lussier YA, Garcia JG. Genomic assessment of a multikinase inhibitor, sorafenib, in a rodent model of pulmonary hypertension. *Physiol. Genomics*. 2008; 33: 278-291.

Nakamura A, Rokosh DG, Paccanaro M, Yee RR, Simpson PC, Grossman W, Foster E. LV systolic performance improves with development of hypertrophy after transverse aortic constriction in mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2001; 281: 1104-1112.

Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, Quaini E, Di Loreto C, Beltrami CA, Krajewski S, Reed JC, Anversa P. Apoptosis in the failing human heart. *N. Engl. J. Med.* 1997; 336: 1131-1141.

Osadchii OE. Cardiac hypertrophy induced by sustained beta-adrenoreceptor activation: pathophysiological aspects. *Heart Fail. Rev.* 2007; 12: 66-86.

Pick R, Janicki JS, Weber KT. Myocardial fibrosis in nonhuman primate with pressure overload hypertrophy. *Am. J. Pathol.* 1989; 135: 771-781.

Ricci R, Eriksson U, Oudit GY, Eferl R, Akhmedov A, Sumara I, Sumara G, Kassiri Z, David JP, Bakiri L, Sasse B, Idarraga MH, Rath M, Kurz D, Theussl HC, Perriard JC, Backx P, Penninger JM, Wagner EF. Distinct functions of junD in cardiac hypertrophy and heart failure. *Genes Dev.* 2005; 19: 208-213.

Rockman HA, Ross RS, Harris AN, Knowlton KU, Steinhilper ME, Field LJ, Ross Jr. J, Chien KR. Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1991; 88: 8277-8281.

Schwartzkopff B, Mundhenke M, Strauer BE. Arterielle Hypertonie und Herzinsuffizienz. *Der Internist.* 2000; 41: 253-260.

Senni M, Tribouilloy CM, Rodeheffer RJ, Jacobsen SJ, Evans JM, Bailey KR, Redfield MM. Congestive heart failure in the community: trends in incidence and survival in a 10-year period. *Arch. Intern. Med.* 1999; 159: 29-34.

Shan R, Price JO, Gaarde WA, Monia BP, Krantz SB, Zhao ZJ. Distinct roles of JNKs/p38 MAP kinase and ERKs in apoptosis and survival of HCD-57 cells induced by withdrawal or addition of erythropoietin. *Blood.* 1999; 94: 4067-4076.

Shevchuk VH, Frantsuzova SB, Horchakova NO, Plyska OI, Babak VV, Arshynnykova LL, Lazoryshynets VV, Iakymovych VV. Contractility and energy metabolism in human myocardium in normal state and in various stages of cardiac insufficiency. *Fiziol. Zh.* 1993; 39: 18-23.

Singh K, Communal C, Sawyer DB, Colucci WS. Adrenergic regulation of myocardial apoptosis. *Cardiovasc. Res.* 2000; 45: 713-719.

Spinarova L, Vitovec J. Neurohumoral changes in chronic heart failure. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky, Olomouc, Czech. Repub.* 2007; 151: 201-207.

Strumberg D, Clark JW, Awada A, Moore MJ, Richly H, Hendlisz A, Hirte HW, Eder JP, Lenz HJ, Schwartz B. Safety, pharmacokinetics, and preliminary antitumor activity of sorafenib: a review of four phase I trials in patients with advanced refractory solid tumors. *Oncologist.* 2007; 12: 426-437.

Strumberg D, Martini B. Sorafenib-Neue Therapieoptionen in der Onkologie. *Arzneimitteltherapie.* 2007; 25: 2-6.

Takano H, Zou Y, Akazawa H, Toko H, Mizukami M, Hasegawa H, Asakawa M, Nagai T, Komuro I. Inhibitory molecules in signal transduction pathways of cardiac hypertrophy. *Hypertens Res.* 2002; 25: 491-498.

Takaoka H, Esposito G, Mao L, Suga H, Rockman HA. Heart size-independent analysis of myocardial function in murine pressure overload hypertrophy. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2002; 282: 2190-2197.

Taniguchi I, Kawai M, Date T, Yoshida S, Seki S, Taniguchi M, Shimizu M, Mochizuki S. Effects of spironolactone during an angiotensin II receptor blocker treatment on the left ventricular mass reduction in hypertensive patients with concentric left ventricular hypertrophy. *Circ. J.* 2006; 70: 995-1000.

Ungvari Z, Gupte SA, Recchia FA, Batkai S, Pacher P. Role of oxidative-nitrosative stress and downstream pathways in various forms of cardiomyopathy and heart failure. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 2005; 3: 221-229.

van den Bosch BJ, Lindsey PJ, van den Burg CM, van der Vlies SA, Lips DJ, van der Vusse GJ, Ayoubi TA, Doevendans PA, Smeets HJ. Early and transient gene expression changes in pressure overload-induced cardiac hypertrophy in mice. *Genomics.* 2006; 88: 480-488.

van Empel VP, Bertrand AT, Hofstra L, Crijns HJ, Doevendans PA, De Windt LJ. Myocyte apoptosis in heart failure. *Cardiovasc. Res.* 2005; 67: 21-29.

Varian KD, Janssen PM. Frequency-dependent acceleration of relaxation involves decreased myofilament calcium sensitivity. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2007; 292: 2212-2219.

Vatner DE, Asai K, Iwase M, Ishikawa Y, Shannon RP, Homcy CJ, Vatner SF. Beta-adrenergic receptor-G protein-adenylyl cyclase signal transduction in the failing heart. *Am. J. Cardiol.* 1999; 83: 80-85.

Wagner RA, Tabibiazar R, Powers J, Bernstein D, Quertermous T. Genome-wide expression profiling of a cardiac pressure overload model identifies major metabolic and signaling pathway responses. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2004; 37: 1159-1170.

Wakatsuki T, Schlessinger J, Elson EL. The biochemical response of the heart to hypertension and exercise. *Trends Biochem. Sci.* 2004; 29: 609-617.

Wang X, Martindale JL, Liu Y, Holbrook NJ. The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival. *Biochem. J.* 1998; 333: 291-300.

Wellbrock C, Karasarides M, Marais R. The RAF proteins take centre stage. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2004; 5: 875-885.

Werner C, Baumhakel M, Teo KK, Schmieder R, Mann J, Unger T, Yusuf S, Bohm M. RAS blockade with ARB and ACE inhibitors: current perspective on rationale and patient selection. *Clin. Res. Cardiol.* 2008; 97: 418-431.

Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, Chen C, Zhang X, Vincent P, McHugh M, Cao Y, Shujath J, Gawlak S, Eveleigh D, Rowley B, Liu L, Adnane L, Lynch M, Auclair D, Taylor I, Gedrich R, Voznesensky A, Riedl B, Post LE, Bollag G, Trail PA. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res.* 2004; 64: 7099-7109.

Wilke A, Funck R, Rupp H, Brilla CG. Effect of the renin-angiotensin-aldosterone system on the cardiac interstitium in heart failure. *Basic Res. Cardiol.* 1996; 91: 79-84.

Witt H, Schubert C, Jaekel J, Fliegner D, Penkalla A, Tiemann K, Stypmann J, Roepcke S, Brokat S, Mahmoodzadeh S, Brozova E, Davidson MM, Ruiz Noppinger P, Grohe C, Regitz-Zagrosek V. Sex-specific pathways in early cardiac response to pressure overload in mice. *J. Mol. Med.* 2008; 86:1013–1024

Yan-ping H, Lian-you Z, Qiang-sun Z, Shao-wei L, Xiao-yan Z, Xiao-long L, Xiao-lin N, Xia L. Mitogenic effect of arginine vasopressin on adult rat cardiac fibroblast: involvement of PKC-erk1/2 pathway. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2008; 52: 72-81.

Zhang X, Hense HW, Riegger GA, Schunkert H. Association of arginine vasopressin and arterial blood pressure in a population-based sample. *J. Hypertens.* 1999; 17: 319-324.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater und Betreuer Priv. doz. Dr. med. G. Baumgarten bedanken, der es mir ermöglicht hat diese Arbeit zu verfassen. Vielen Dank für die Geduld und das Vertrauen.

Meiner Frau einen ganz besonderen Dank für ihre Nachsicht und die Zeit, die sie mir gegeben hat, in dem sie sich aufopferungsvoll um Leander und Lara gekümmert hat (und seit kurzem auch um unseren dritten Spross Eliza).

Ich möchte Leander, Lara und Eliza dafür danken, dass sie da sind und mein Leben jeden Tag bereichern, einfach weil sie eben da sind.

Ein besonderer Dank an Frau Dr. rer. nat. Heidi Ehrentraut, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat und in so manch einer scheinbar ausweglosen Phase mit der richtigen Inspiration und Hilfestellung ein Weitermachen erst möglich gemacht hat.

Danke auch an Dr. med. vet. Volker Vervölgyi, der mich in die Operations- und Messverfahren eingewiesen hat und mir seine Bilder freundlicher Weise zur Verfügung gestellt hat, die zum Teil in dieser Arbeit zu sehen sind. Dieser Dank gilt auch Frau Dr. vet. med. Anne Bittig, deren Bilder ich ebenfalls zur Verfügung gestellt bekommen habe. Meinem Vater und meinem Bruder, die mir am Ende noch mal Ihre Augen geliehen haben, sowie meiner ganzen restlichen Familie, die immer an mich geglaubt haben, einen herzlichen Dank.

Ein letzter Dank an die gesamte Arbeitsgruppe, in der ich mich immer sehr wohl gefühlt habe und wo ich immer einen Ansprechpartner finden konnte, der mir mit Rat, und gar nicht so selten, auch mit Tat zur Seite stand.