

Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie
(Direktor: Prof. Dr. Thomas Eschenhagen)
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

**Wirkungsweise des Nitroxyldonator NCA an isolierten Kardio-
myozyten und am Langendorff-perfundierten Herz der Maus**

DISSERTATION

zur

Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Felix Böttcher

aus Hamburg

Hamburg 2009

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 14.04.2010

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. R. Böger

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. S. Baldus

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: PD Dr. T. Rostock

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
1 Einleitung	5
1.1 Das Herz – Motor des kardiovaskulären Systems.....	6
1.1.1 Mechanismus der elektromechanischen Kopplung	6
1.1.2 Modulation der Kontraktion	10
1.2 Die Chemie von HNO	11
1.3 HNO - Donatoren	13
1.4 Die Pharmakologie von HNO	15
1.5 Fragestellung.....	17
2 Material und Methoden	18
2.1 MyBPC2 Maus	18
2.2 Isolation von intakten Kardiomyozyten aus ventrikulärem Herzmuskelgewebe	18
2.3 IonOptix System – Akquisition und Analyse	20
2.3.1 Versuchsaufbau	20
2.3.2 Funktionsweise der Sarkomerlängenmessung.....	21
2.3.3 Kurvenparameter der Sarkomerlängenmessung.....	22
2.3.4 Messung der intrazellulären Kalziumströme mit Fura-2	23
2.3.5 Kurvenparameter der Kalziumströme.....	28
2.4 Kontraktilitätsmessung am intakten Langendorff-perfundierten Herz	30
2.5 HNO Donator „NCA“	30
2.6 HPLC Analyse der Reaktion von NCA mit Glutathion	32
2.7 Statistische Analyse	33
2.8 Liste der Chemikalien	33
2.9 Liste der Laborgeräte	34
2.10 Liste der Verbrauchsmaterialien.....	36
3 Ergebnisse	37
3.1 Wirkung von NCA auf die Sarkomerlänge	37
3.1.1 Herstellung einer Dosis-Wirkungs-Beziehung	38
3.1.2 Veränderung der Kontraktionskurvenparameter.....	39
3.2 Wirkungen von NCA auf die intrazelluläre Kalziumionenzirkulation	40

3.2.1	Veränderung der Kurvenparameter der Kalziumtransienten	40
3.3	Überprüfung der pharmakologisch wirksamen Substanz	42
3.4	Wirkung von NCA auf die Kontraktionskraft von intakten Langendorff-perfundierten Mausherzen	42
3.5	Vergleich der Pharmakokinetik der HNO Donatoren <i>Angeli's Salz</i> und NCA mittels HPLC.....	43
3.5.1	Produkte der Reaktion zwischen <i>Angeli's Salz</i> und Glutathion	43
3.5.2	Produkte der Reaktion zwischen NCA und Glutathion	44
4	Diskussion	45
4.1	Wirkung von NCA auf die Sarkomerlänge	46
4.2	Wirkungen von NCA auf die intrazelluläre Kalziumionenzirkulation	47
4.3	Überprüfung der pharmakologisch wirksamen Substanz	48
4.4	Wirkung von NCA auf die Kontraktionskraft von intakten Langendorff-perfundierten Mausherzen	48
4.5	Möglichkeiten des therapeutischen Einsatzes bei Herzinsuffizienz	49
4.6	Vergleich der Pharmakokinetik der HNO Donatoren <i>Angeli's Salz</i> und NCA mittels HPLC.....	50
5	Zusammenfassung.....	51
6	Abkürzungsverzeichnis	52
7	Literaturverzeichnis	55
8	Lebenslauf	58
9	Eidesstattliche Versicherung	59
10	Danksagung.....	60

1 Einleitung

Vor 20 Jahren erschienen erste Studien über die körpereigene Synthese von Stickstoffmonoxid (NO). Seitdem ist das Interesse an NO und verwandten Stickstoffoxiden massiv gestiegen. Diesem Interesse an der Physiologie, Pathophysiologie, Biochemie und Pharmakologie von NO und den verwandten Spezies wurde in den letzten Jahren durch die Forschung Rechnung getragen. NO verwandte Stickstoffoxide entstehen im Körper durch Reaktion mit molekularem Sauerstoff oder mit aus Sauerstoffverbindungen hervorgegangenen Molekülen, wie z.B. O_2^- . Auf Grund der oxidativen Umgebung in Säugetierzellen wurde den oxidierten Molekülen von NO, wie z.B. Stickstoffdioxid (NO_2), Peroxynitrit ($ONOO^-$) und Distickstofftrioxid (N_2O_3), das Hauptinteresse entgegengebracht.

Bis vergleichende Studien mit *Angeli's Salz*, einem Nitroxyl-Donator, einzigartige Wirkungen auf das kardiovaskuläre System gezeigt haben (Wink DA et al., 2003), wurde den reduzierten Stickstoffverbindungen, wie Nitroxyl, nur wenig Interesse geschenkt. In den letzten Jahren jedoch hat diese Stickstoffverbindung mit der chemischen Formel HNO immer größeres Interesse erlangt. Dies liegt vor allem daran, dass mehrere Studien vermuten lassen, dass HNO endogen produziert wird (Wong PS et al., 1998; Fukuto JM et al., 2005(a); Fukuto JM et al., 2005(b); Donzelli S et al., 2008), wobei ein direkter Nachweis bisher nicht möglich war. Dazu trägt auch bei, dass aus der Reihe der verschiedenen Stickstoff-Spezies HNO am wenigsten verstanden ist, da es durch seine hohe Reaktivität der Untersuchung schwer zugänglich ist.

Vor allem die Wirkungen auf das Herzmuskelgewebe und das vaskuläre System, welche auf mögliche Alternativen zu bisherigen Therapieansätzen von z.B. der Herzinsuffizienz deuten, nähren das Interesse der Forschung.

1.1 Das Herz – Motor des kardiovaskulären Systems

Das Herz sichert durch einen ständigen Zyklus aus Kontraktion und anschließender Entspannung der Vorhöfe und Kammern den im Körper lebenswichtigen Blutfluss. Für die Erregung sind primäre Schrittmacherzellen im Sinusknoten verantwortlich, welche den autonomen Herzrhythmus vorgeben. Die Kardiomyozyten sind durch Gap Junctions verbunden und bilden ein funktionelles Synzytium, welches bei überschwelligen Reizen einzelner Zellen mit einer „Alles oder Nichts“ - Antwort des gesamten Herzmuskels reagiert. Der normale Sinusrhythmus des Herzens beträgt 60 – 80 Schläge pro Minute.

1.1.1 Mechanismus der elektromechanischen Kopplung

In den Kardiomyozyten dient ebenso wie in den Zellen der Skelettmuskulatur das transversale Tubulus – System (T – System) der Weiterleitung der elektrischen Erregung von der Peripherie ins Zellinnere. Ein longitudinales System ergänzt das T - System und dient als Calcium – Ionen Speicher (Ca^{2+}). Während der Ruhephase der Kardiomyozyten beträgt die intrazelluläre Ca^{2+} - Konzentration nur 10^{-7} M. Nach einem initialen Einstrom von Natrium – Ionen in das Zellinnere gelangt eine kleine Menge Ca^{2+} - Ionen durch L – Typ Ca^{2+} - Kanäle aus dem T – System ins Zytoplasma. Diese Kanäle werden auch Dihydropyridinrezeptoren (DHPR) genannt, da sie durch gleichnamige Pharmaka geblockt werden. Der extrazelluläre Ca^{2+} - Einstrom macht nur ein Fünftel der für eine Kontraktion intrazellulär benötigten Ca^{2+} - Ionen aus. Der Einstrom von extrazellulär wirkt jedoch stimulierend auf die Freisetzung größerer Mengen an Ca^{2+} - Ionen aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR). Dieser Vorgang ist die sog. kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung (CICR). Hierbei binden Ca^{2+} - Ionen an die Ryanodin-Rezeptoren Typ 2 (RyR2) des SR, welche sich daraufhin öffnen und den Einstrom von intrazellulär gespeicherten Ca^{2+} - Ionen in das Zytoplasma ermöglichen. Die Konzentration der intrazellulär vorliegenden Ca^{2+} - Ionen beträgt nun 10^{-5} M, was die Auslösung einer Verkürzung der Myofibrillen zur Folge hat (Abb. 1.1).

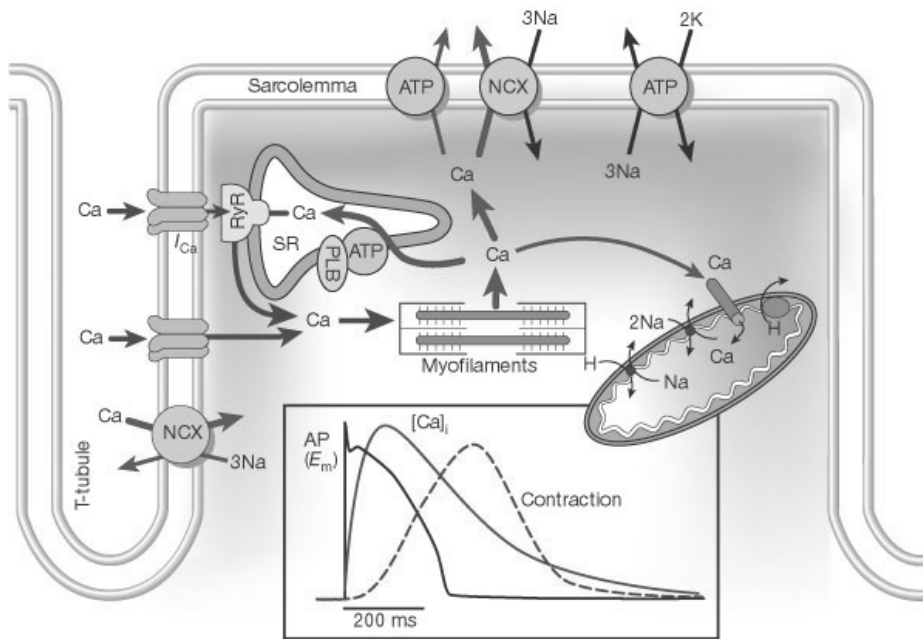


Abb. 1.1 Kontraktionsauslösung in einer ventrikulären Herzmuskelzelle: Abhängigkeit von Kalziumionenzirkulation. RyR: Ryanodinrezeptor; PLB: Phospholamban; ATP: ATPase; NCX: $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauscher; SR: Sarkoplasmatisches Retikulum; AP: Aktionspotenzial; $[\text{Ca}]_i$: intrazellulärer Kalziumstrom (Bers DM, 2002)

Die kleinste funktionelle Einheit einer Muskelfibrille ist das Sarkomer. Ein Sarkomer besitzt eine charakteristische Bandenstreifung, welche im Polarisationsmikroskop gut zu erkennen ist. Z-Scheiben begrenzen das Sarkomer zu seinen Seiten. An ihnen sind Aktinfilamente (thin filaments) angeheftet, welche zwischen die dickeren Myosinfilamente (thick filaments) ragen. Die Myosinfilamente sind zwischen den Z-Scheiben zentrisch mit dem Protein Titin elastisch aufgehängt. Titin besitzt dehnbare Anteile, welche zum einen eine Rückstellkraft bei der Entspannung, zum anderen einen Widerstand gegen eine Dehnung der Herzmuskelzelle bereitstellen (Granzier HL, Labeit S, 2004). Genau in der Mitte eines Sarkomers befindet sich die M-Scheibe, welche wahrscheinlich zusammen mit den Z-Scheiben zur Querstabilisierung des Sarkomers dienen. Die Umgebung der M-Scheibe wird H-Zone genannt und beinhaltet ausschließlich Myosinfilamente. Die Zone um die Z-Scheibe ist die I-Bande, welche ausschließ-

lich Aktinfilamente beinhaltet. Im Polarisationsmikroskop ist diese Bande isotrop. Der Bereich zwischen zwei I-Banden ist anisotrop, was zur Bezeichnung A-Bande führt (Abb. 1.2).

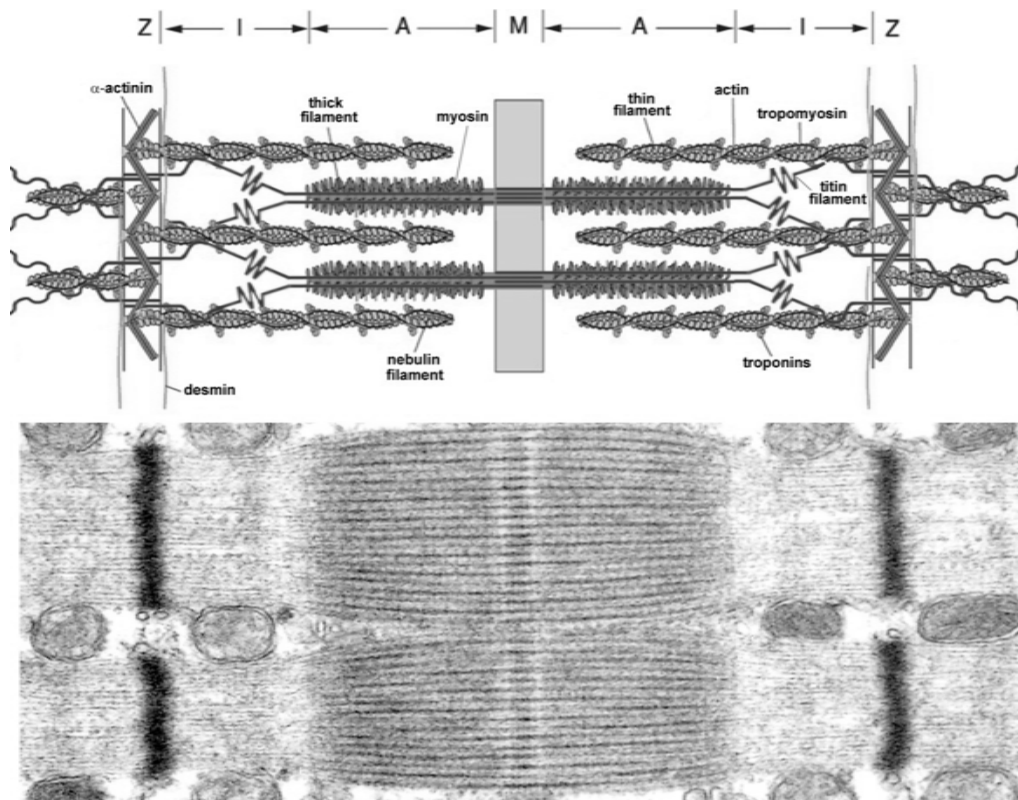


Abb. 1.2 Aufbau eines Sarkomers – oben: struktureller Aufbau; unten: ER-mikroskopische Aufnahme (Ottenheim C et al. 2008)

Ein Myosinfilament ist aus etwa 350 Myosinmolekülen aufgebaut. Jedes Myosinmolekül besteht aus zwei schweren und vier leichten Polypeptidketten. Die beiden schweren Ketten besitzen neben je einem langen Schwanzteil auch je ein biegsames Halsteil mit je einem globulären Ende. Dieser Kopfteil ist fähig, Brücken zwischen Myosin und Aktin zu bilden und besitzt eine ATPase-Aktivität zur Energiegewinnung. Durch die Flexibilität des Halsteils ist die Beweglichkeit der Filamente gegeneinander auch bei Brückenbildung gewährleistet. Ein Aktinfilament besteht aus zwei helikal umeinander geschlungenen Ketten von filamentärem Aktin. Der Regulatorproteinkomplex Tropomyosin/Troponin ist dem Aktinfilament zugeordnet. Der heterotrimere Troponinkomplex, bestehend aus

Troponin C, I und T, interagiert mit Tropomyosin und dem filamentären Aktin und reguliert dadurch die Beziehung zwischen den dicken und dünnen Filamenten. Troponin C besitzt eine Bindungsstelle für Ca^{2+} -Ionen. Im Zustand der Entspannung blockieren Troponin I und Tropomyosin die Bindungsstellen für die Myosinmoleküle.

Um ein Myosinfilament sind jeweils sechs Aktinfilamente angeordnet, welche durch das Protein Nebulin in Position gehalten werden. Die durch eine Bindung eines Ca^{2+} -Ions hervorgerufene Konformitätsänderung am Troponin C führt zu einer Aufhebung der Blockade der Myosin-Bindungsstellen am Aktinfilament. Es entstehen starke, kraftgenerierende Querbrücken zwischen den Myosin- und den Aktinfilamenten. Durch die ATPase-Aktivität des globulären Kopfes wird Energie für den repetitiv durchlaufenden Querbrückenzyklus bereitgestellt. Hierbei vollziehen die Kopfteile des Myosinmoleküls eine Drehbewegung, wodurch die Aktin- und Myosinfilamente aneinander vorbeigleiten, was einer Verkürzung des Sarkomers entspricht. Die Filamente verkürzen sich bei diesem Vorgang jedoch nicht. Während die Myosinfilamente sich auf die Z-Streifen zubewegen, dringen die Aktinfilamente tiefer in das Sarkomer hinein. Daher bleibt der A-Streifen konstant, während sich die I- und H-Banden verkürzen. Diese unter dem Mikroskop sichtbare zyklische Veränderung des Bandenmusters ermöglicht die Auswertung der Kontraktilität in einer arbeitenden Herzmuskelzelle (s. 2.3.2).

Bei gleichbleibender intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration würde der Querbrückenzyklus weiterhin bestehen bleiben und die Verkürzung des Sarkomers aufrechterhalten. Durch die Entfernung der vorher freigesetzten Ca^{2+} -Ionen aus dem Zytoplasma wird der Kontraktionsmechanismus gehemmt. Den überwiegenden Anteil bewältigt die Sarkoendoplasmatische Ca^{2+} -ATPase (SERCA). Beim Menschen wird mit Hilfe dieser Pumpe 70% des freigesetzten Ca^{2+} wieder in das SR befördert – beim Kaninchen liegt der Anteil bei 72 %, bei der Ratte bei 92% (Bers DM, 2002). Die SERCA wird über das Regulatorprotein Phospholamban gesteuert, welches modulierend in die Funktionalität eingreift (s. 1.1.2).

Der Rest des zuvor freigesetzten Ca^{2+} wird mit Hilfe des Na^+ - Ca^{2+} -

Austauschers (NCX) aus der Zelle entfernt. Hierbei werden für ein ausströmendes Ca^{2+} -Ion drei Na^{+} -Ionen in die Zelle befördert. Je geringer jedoch das Na^{+} -Gefälle über der Zellmembran, desto langsamer geht der Abtransport von Ca^{2+} -Ionen von statten.

1.1.2 Modulation der Kontraktion

Der Herzmuskel besitzt zahlreiche Anpassungsmechanismen, um den schwankenden Anforderungen des Organismus an die Blutversorgung gerecht zu werden. Diese Möglichkeit zur Adaptation ist durch die kontraktile Reserve in Form von großen Ca^{2+} -Speichermengen gegeben. Da nur eine geringe Menge des im SR vorhandenen Ca^{2+} für die Auslösung einer Kontraktion benötigt wird, steht immer eine genügend große Reserve für eine Modulation der Kraft und Frequenz der Kontraktion und der Entspannung zur Verfügung.

Das autonome Nervensystem erhält über den Sympathikus und den Parasympathikus und deren entsprechenden Rezeptoren eine modulierende Eigenschaft auf den Herzmuskel. Der wichtigste Signalweg für eine Erhöhung der Kontraktilität der Kardiomyozyten läuft über eine Stimulation der β -adrenergen Rezeptoren. Im gesunden menschlichen Herz beträgt der Anteil an β_1 -Rezeptoren ca. 70%, der Anteil der β_2 -Rezeptoren ca. 30% (Bristow MR, 2000). Nach Bindung von Adrenalin oder Noradrenalin an einen β -Rezeptor wird die Adenylatcyclase über ein stimulierendes G-Protein aktiviert. Diese bildet zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), welches wiederum die Proteinkinase A (PKA) aktiviert. Das cAMP ist ein starker Wachstumsfaktor. Die PKA besitzt die Fähigkeit Ca^{2+} -Kanäle zu phosphorylieren und ihre Offenwahrscheinlichkeit zu erhöhen. Dieser Aktivierung unterliegen die DHPR und die RyR2. Somit erhöht sich bei β -adrenerger Aktivierung des Kardiomyozyten die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration. Die Regulation der SERCA unterliegt dem Molekül Phospholamban, welches im phosphorylierten Zustand die Wiederaufnahme von Ca^{2+} -Ionen in das SR begünstigt (Bers DM, 2002). Zusätzlich senkt die Phosphorylierung von Aktinfilamenten die Ca^{2+} -Sensitivität (Cazorla O et al., 2006), was zu einer beschleunigten Entspannung des Kardiomyozyten führt (Kentish JC et al.,

2001). Diese Veränderungen im Kardiomyozyten führen zu einer Erhöhung der Kontraktionskraft (positive Inotropie) und der Frequenz (positive Chronotropie).

Bei der Herzinsuffizienz liegt eine chronische Aktivierung des β -adrenergen Systems vor, welche zu einer verminderten Genexpression und Entkopplung der β -adrenergen Rezeptoren führt (Bristow MR, 2000), (El-Armouche A, Eschenhagen T, 2008). Dem Herz fehlt weitgehend die Möglichkeit sich an die veränderten Umstände bei Belastung anzupassen, da der PKA vermittelte Einfluss auf das intrazelluläre Kalziummanagement vermindert ist. Durch β -Blocker kann die Aktivierung der Rezeptoren durch das β -adrenerge System kompetitiv gehemmt werden, was klinisch zu einer erniedrigten Sterblichkeitsrate und Morbiditätsrate führt (Bristow MR, 2000). β -Blocker wirken negativ dromotrop, negativ inotrop und negativ chronotrop auf das Herz. Gleichzeitig erfolgt je nach Medikamentengeneration eine unterschiedlich stark ausgeprägte systemische Vasokonstriktion und eine Vasokonstriktion der Koronargefäße. Kontraindikationen sind Asthma bronchiale, AV – Block II. und III. Grades, symptomatische Bradykardie/Hypotonie und Sinusknotensyndrom (Leitlinien Herzinsuffizienz der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie- Herz- und Kreislaufforschung e.V.).

1.2 Die Chemie von HNO

HNO ist die durch ein Elektron reduzierte und protonierte Form von NO. Obwohl nur ein dreiatomiges Molekül, ist die Chemie von HNO sehr komplex. Die hohe Reaktivität des Moleküls gegenüber anderen Verbindungen oder sich selbst erschwert die Arbeit. Im Folgenden werden die wichtigsten chemischen Eigenschaften von HNO dargestellt, deren Kenntnis für Untersuchungen an diesem Molekül essentiell ist. Neuere Studien zeigen, dass HNO bei physiologischem pH-Wert, entgegen früherer Annahme, eine schwache Säure ist ($pK_a > 11$) (Fukuto JM et al., 2005(a); Fukuto JM et al., 2005(b)). Trotz dieser hohen Säurekonstante müsste genügend NO^- entstehen, um signifikante biochemische Reaktionen zu erwirken. Da die Säure und ihre konjugierte Base jedoch verschiedene spin states besitzen, ist die hohe kinetische Barriere dafür verantwortlich, dass ein Protonentransfer sehr unwahrscheinlich ist (Paolocci N et al., 2007; Fukuto JM et al., 2005(a); Fukuto JM et al., 2005(b)). Daraus folgt, dass

nahezu ausschließlich die biochemischen Effekte der Ausgangsspezies wirksam werden. Die Entstehung von HNO durch Reduktion von NO ist auf Grund des schlechten Reduktionspotentials von $< -0,4$ V (vs. NHE) (Fukuto JM et al., 2005(a)) sehr unwahrscheinlich. Trotzdem wurde herausgefunden, dass unter anaeroben Umständen und in Anwesenheit von hohen NO - Konzentrationen HNO gebildet werden kann (Paolocci N et al., 2007).

Das große Problem bei der Arbeit mit HNO ist seine Metastabilität. HNO reagiert leicht mit sich selbst, dimerisiert unter gewissen Umständen und bildet $\text{H}_2\text{N}_2\text{O}_2$, welches dann durch Zerfall N_2O bildet (Paolocci N et al., 2007; Fukuto JM et al., 2005(a); Fukuto JM et al., 2005(b)). Da aus diesem Grund die Lagerung von HNO große Schwierigkeiten bereitet, werden bei Studien HNO-Donatoren wie z.B. das schon erwähnte *Angeli's Salz* verwendet. Auch in biologischer Umgebung ist die Stabilität von HNO sehr gering, da es eine hohe Reaktivität gegenüber anderen Verbindungen aufweist. Hervorzuheben ist hier die sehr gute Reaktivität des elektrophilen HNO gegenüber nukleophilen Thiolen oder Proteinen mit Thiol-Struktur und Metalloproteinen (Paolocci N et al., 2007; Fukuto JM et al., 2005(a); Fukuto JM et al., 2005(b)), welchen wichtige Kontrollfunktionen innerhalb des Zellmilieus zugeschrieben werden und möglicherweise für die pharmakologischen Wirkungen von HNO verantwortlich sind. Vor allem die Reaktion von HNO mit Glutathion (GSH) findet große Beachtung, da GSH innerhalb der Zelle in großen Mengen zur Verfügung steht (1-10 mM) (Donzelli S et al., 2006) und es gleichzeitig über eine hohe Reaktivität gegenüber HNO verfügt (Paolocci N et al., 2007; Fukuto JM et al., 2005(b); Donzelli S et al., 2006). Außerdem wird der intrazellulären GSH-Konzentration eine wichtige Rolle bei der Beeinflussung des Redoxstatus der Zelle zugeschrieben (Paolocci N et al., 2007). Auf Grund der großen Menge an GSH in der Zelle müsste HNO sofort nukleophil angegriffen werden und wäre nicht mehr verfügbar, um andere Reaktionen einzugehen. Offensichtlich ist die Reaktivität von HNO und Thiolaten (RS^-) jedoch der Reaktivität zwischen HNO und Thiolen überlegen (Donzelli S et al., 2006). Daraus folgt, dass Proteine mit niedrigen Thiol pKa-Werten wahrscheinlich sogar in Anwesenheit von großen Mengen GSH mit HNO interagieren (Paolocci N et al., 2007).

Der direkte Nachweis von HNO ist wegen der oben genannten Eigenschaften, nämlich der schnellen Autoreaktivität und der hohen Reaktivität gegenüber anderen intrazellulären Molekülen, nicht möglich. Das Produkt der Dimerisierung von HNO ist N₂O (Paolocci N et al., 2007; Fukuto JM et al., 2005(a)). Es ist aus biologischer Umgebung jedoch schwierig zu quantifizieren. Hinzu kommt, dass die Bestimmung von N₂O nicht genügend Aussagekraft über die Anwesenheit von freiem HNO besitzt, da die Autoreaktion in biologischer Umgebung nur eine untergeordnete Rolle spielt und N₂O auch noch über den Zerfall von Stickstoffoxiden gebildet werden kann (Yoo J, Fukuto JM, 1995). Donzelli et al. zeigten, dass die Reaktion von HNO (Abb.1.3), freigesetzt von *Angeli's Salz*, mit GSH unter anderem zur Bildung von Sulfinamid (GS(O)NH₂) führt (Donzelli S et al., 2006), welches ein Produkt von hoher Stabilität ist, selbst bei unterschiedlichen pH-Werten innerhalb der Zelle. Von bedeutender Wichtigkeit ist zudem, dass Sulfinamid nicht von anderen Stickstoffoxiden gebildet werden kann und somit als eindeutiger Marker für die Anwesenheit von freiem HNO dienen könnte (Donzelli S et al., 2006). Sulfinamid kann mittels HPLC (Hochleistungsflüssigkeitschromatografie) oder Massenspektrometrie (MS) bestimmt werden.

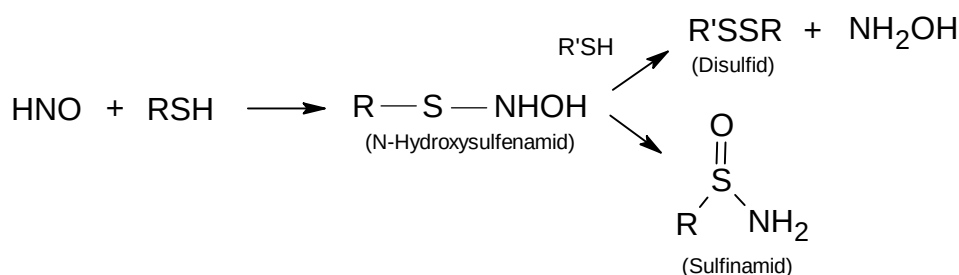


Abb. 1.3 Reaktion von HNO mit Thiolstrukturen

1.3 HNO - Donatoren

Da es auf Grund der geringen Stabilität nicht möglich ist, HNO zu lagern, wird für experimentelle Studien auf HNO-Donatoren zurückgegriffen, die die Fähigkeit besitzen, HNO freizusetzen. Das bereits oben genannte *Angeli's Salz* (Na₂N₂O₂) wird am häufigsten eingesetzt und ist am besten erforscht (Abb. 1.4). Der Nachteil liegt in der sehr schnellen Freisetzung von HNO (Fukuto JM et al.,

2005(a)) und dem alkalischen pH-Wert, hervorgerufen durch das Lösungsmittel NaOH. Somit ist die Aussagekraft von Experimenten in biologischen Systemen mit *Angeli's Salz* als HNO-Donator limitiert. Ein weiterer Donator ist das *Cyanamid*, welches schon heute zur Therapie des Alkoholismus eingesetzt wird (s. 1.3). Neue und bisher wenig erforschte Donatoren sind *Hydroxylamin* (NH₂OH), bei dem es sich um die 2-fach reduzierte Form von HNO handelt, und *NCA* (Abb. 1.5). Die zweifache Oxidation von *Hydroxylamin* wird als ein möglicher Weg der endogenen Bildung von HNO angesehen, wodurch dieser HNO-Donator besonders interessant ist (Paolocci N et al., 2007; Donzelli S et al., 2006). Bei *NCA* handelt es sich um eine neue Verbindung aus der Klasse der *Acyloxy Nitroso Compounds*, welche durch Hydrolyse oder Esterase-Aktivität HNO freisetzen. Diese besitzen, im Vergleich zu *Angeli's Salz*, den Vorteil, dass HNO nur langsam und steuerbar abgegeben wird und sie außerdem unter physiologischen Bedingungen wirksam sind (Paolocci N et al., 2007; Sha X et al., 2006).

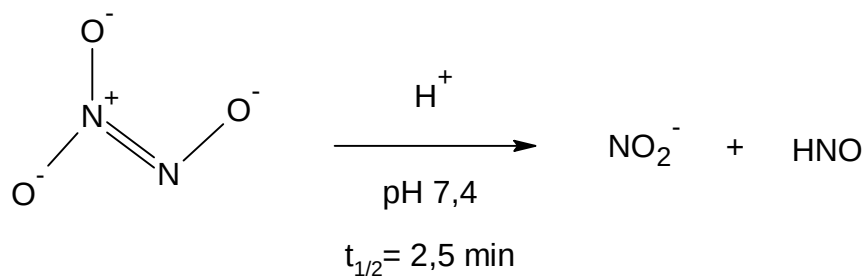


Abb. 1.4 Donator *Angeli's Salz*

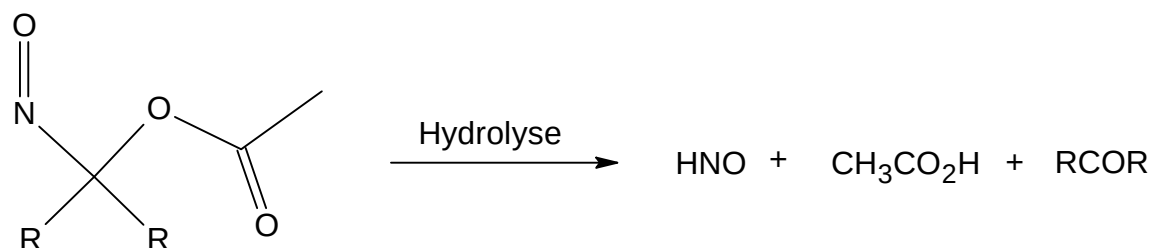


Abb. 1.5 Donator *NCA*

1.4 Die Pharmakologie von HNO

HNO besitzt ein großes Repertoire an pharmakologischen Wirkungen auf den Organismus, die zur Zeit noch nicht gänzlich verstanden sind, aber ein immenses Potential vermuten lassen. Wie schon bei den HNO-Donatoren erwähnt, wird *Cyanamid* in der Therapie des Alkoholismus eingesetzt. Durch oxidative Bioaktivierung des *Cyanamids* wird HNO gebildet (Paolucci N et al., 2007; Fukuto JM et al., 2005(a)). Dieses deaktiviert das Enzym Aldehyddehydrogenase durch eine Modifikation des Cystein-Thiolats im aktiven Zentrum (Paolucci N et al., 2007; DeMaster EG et al., 1998). Diese Wirkung zeigt die Thiophilie des HNO, besonders gegenüber Thiol-Proteinen. Obwohl ein riesiger Überschuss an GSH innerhalb der Zellen herrscht, reagiert das HNO offensichtlich bevorzugt mit bestimmten protein-assoziierten Thiolen (Paolucci N et al., 2007; Donzelli S et al., 2006). Selbst bei extrem kleinen Konzentrationen von HNO konnte die Hefe-Glykolyse gestoppt werden, ohne das GSH Level (1-10 mM) signifikant zu ändern (Paolucci N et al., 2007; Donzelli S et al., 2006; Irvine JC et al., 2008). Diese hohe Spezifität ist wahrscheinlich ein wichtiger Faktor für die Vielzahl von pharmakologischen Wirkungen.

Die zur Zeit vielversprechendsten Wirkungen von HNO sind die Effekte auf das kardiovaskuläre System. Seit den 90er Jahren ist bekannt, dass HNO eine vasodilatatorische Wirkung auf das periphere System ausübt. Der genaue Mechanismus, wie die Wirkung zustande kommt, ist bisher nicht bekannt. Es wird vermutet, dass eine Aktivierung von spannungsabhängigen Kaliumkanälen (Paolucci N et al., 2007) zu einer Hyperpolarisation und somit zu einer Entspannung der glatten Muskelzellen führt. Ein weiterer Signalweg ist die Aktivierung von CGRP (calcitonin gene-related receptor), was zu einer Erhöhung des cAMP-Spiegels und der Phosphorylierung von L-Typ Kalziumkanälen führt. Außerdem wurde in Studien gezeigt, dass die Vasodilatation ohne eine Erhöhung der cGMP Konzentration und unabhängig vom β -adrenergen System erfolgt (Paolucci N et al., 2007; Fukuto JM et al., 2005(a); Paolucci N et al., 2001).

Gleichzeitig besitzt HNO die Eigenschaft, Wirkung auf die Kontraktilität des Herzmuskels auszuüben. Unter Einfluss von HNO wird die Inotropie des Herzens positiv beeinflusst, bei gleichzeitig beschleunigter Entladung und Entspan-

nung der Ventrikel (Paolucci N et al., 2007; Paolucci N et al., 2001; Paolucci N et al., 2003). Interessant ist, dass die Wirkung von HNO auf den Herzmuskel unabhängig vom Preload ist (Paolucci N et al., 2007). Die Kombination dieser Wirkungen auf das kardiovaskuläre System, nämlich die positive Inotropie, die beschleunigte Entladung des Ventrikels und die vasodilatatorische Wirkung auf das periphere System, bieten ein großes Potential in der Therapie der Herzinsuffizienz. Als Wirkmechanismus wird eine Aktivierung der Ryanodinrezeptoren (RyR_2) und eine Stimulation der Ca^{2+} - ATPase, welche die Wiederaufnahme des Calciums in das sarkoplasmatische Retikulum beschleunigt, vermutet (Paolucci N et al., 2007; Tocchetti CG et al., 2007). Die Inotropie wird in einer cAMP- und cGMP-unabhängigen Weise gesteigert. cAMP ist ein starker Wachstumspromotor (Bristow MR, 2000). Welche genauen Angriffspunkte, wahrscheinlich protein-assoziierte Thiole (Tocchetti CG et al., 2007), für diese Wirkungen zuständig sind, ist noch zu klären.

Die Effektivität von β -Blockern wird nicht beeinflusst und HNO wirkt additiv zu β -Agonisten (Paolucci N et al., 2007; Tocchetti CG et al., 2007; Paolucci N et al., 2003). Ein möglicher Einsatz von HNO in der Therapie der Herzinsuffizienz könnte das bisherige Therapiespektrum erweitern.

Eine weitere interessante pharmakologische Wirkung von HNO ist die Senkung der Gefahr von Reperfusionsschäden im Myokard nach einer Ischämie. Weiterhin wurde festgestellt, dass HNO eine Art protektive Wirkung gegenüber irreversiblen Verletzungen des Myokards und post-ischämischen Dysfunktionen aufweist (Paolucci N et al., 2007; Fukuto JM et al., 2005(a); Fukuto JM et al., 2005(b); Donzelli S et al., 2006). Die genauen Mechanismen für diese Wirkungen sind bisher unbekannt. Auf weitere pharmakologische Effekte soll an dieser Stelle nicht eingegangen werden, da sich das Thema dieser Promotion nur auf die kardiovaskulären Wirkungen beschränkt.

1.5 Fragestellung

Das Ziel dieser Arbeit war es, die pharmakologischen Wirkungen von HNO am Herzmuskel mit Hilfe des neuartigen Donators *NCA*, welcher entscheidende Vorteile gegenüber den bisherigen Donatoren wie *Angeli's Salz* besitzt, zu überprüfen.

Hierzu wurden Kontraktilitätsmessungen an isolierten Herzmuskelzellen durchgeführt und die Ergebnisse am intakten Herzmuskel überprüft. Mittels HPLC wurde versucht, die Pharmakokinetik von *NCA* zu überprüfen.

Im Speziellen wurde Folgendes überprüft:

- Erzielt *NCA* eine vergleichbare Steigerung der Kontraktilität an isolierten Herzmuskelzellen und am intakten Herzmuskel?
- Welche Konzentrationen des Donators werden benötigt?
- Liegt der Wirkung, wie bei anderen Donatoren vermutet, eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumzirkulation zu Grunde?

2 Material und Methoden

2.1 MyBPC2 Maus

Als Versuchstier für die folgenden Methoden (s. 2.2 und 2.3) wurde die Wildtyp-Maus der Linie MyBPC2 mit C57/B6 Hintergrund verwendet. Die Tiere waren zum Zeitpunkt des Versuchs 12-15 Wochen alt. Versuchstiere beider Geschlechter wurden verwendet. Für die Tierversuche liegt eine Genehmigung der Behörde für Wissenschaft und Gesundheit der Freien und Hansestadt Hamburg vor (G 21/1-46/04).

2.2 Isolation von intakten Kardiomyozyten aus ventrikulärem Herzmuskelgewebe

Die Isolation von adulten Maus-Kardiomyozyten wurde mit Hilfe einer enzymgestützten Perfusionsmethode nach einem modifizierten Protokoll von O'Connell u.a. (O'Connell T et al., 2003) durchgeführt. Um die Bildung von gerinnungsbedingten Thromben in den Herzkranzgefäßen zu verhindern, wurde den Mäusen ca. 10 Minuten vor der Tötung intraperitoneal Heparin injiziert (0,05 ml einer 10.000 IU/ml Stammlösung = 500 IU). In der Zwischenzeit wurde der experimentelle Aufbau vorbereitet. Nach der Anästhesie mit CO₂ wurden die Mäuse durch Genickbruch und anschließender Enthauptung getötet. Der Thorax wurde durch einen horizontalen Schnitt kaudal des letzten Rippenpaares und zwei lateralen Entlastungsschnitten eröffnet. Die Aorta wurde dargestellt und 1-2 mm über ihrem Austritt aus dem Herzen durchtrennt. Anschließend wurde das Herz so schnell wie möglich aus dem Situs entfernt. Eine Kanüle wurde mit Hilfe von zwei sehr feinen curve-tip Pinzetten (Dumont #7 0,007 mm x 0,04 mm, Fine Science Tools, USA) in die übriggebliebenen 1-2 mm der Aorta eingeführt. Ein Faden fixierte die Aorta an der Kanüle. Das Herz wurde in ein temperiertes Perfusionssystem (Abb. 2.1) überführt. Um eine möglichst große Ausbeute an intakten Kardiomyozyten zu gewährleisten, muss die Zeitspanne zwischen der

Tötung des Versuchstieres und dem Zeitpunkt des Puffereintritts in die Koronargefäße möglichst gering gehalten werden. Eine konstante Temperatur von 37 °C am Kanülenaustritt und eine konstante Flussgeschwindigkeit von 3 ml/min garantierten reproduzierbare Versuchsbedingungen. Das Herz wurde mit einem Kalzium freien Puffer (in mM: 113 NaCl, 4,7 KCl, 0,6 KH₂PO₄, 0,6 Na₂HPO₄, 1,2 MgSO₄, 12 NaHCO₃, 10 KHCO₃, 10 HEPES (pH 7,46), 30 Taurin, 10 2,3-butandion monoxim (BDM), 5,5 Glukose) perfundiert. Auf 8 Minuten Perfusion mit diesem Puffer folgten 9 Minuten mit einem Verdauungspuffer, welcher zusätzlich 0,1 mg/ml von rekombinaten Kollagenasen/Proteasen (Liberase Blendzyme 3, Roche Diagnostics) und 12,5 µM CaCl₂ enthielt. Anschließend wurden die Herzkammern unterhalb der Vorhöfe abgetrennt und in 2,5 ml Verdauungspuffer überführt. Das Gewebe wurde nun mit Hilfe von Pinzetten und einer Pipette mit weiter Öffnung dissoziiert. Die Hinzugabe von Perfusionspuffer, mit zusätzlich 10% fetalem bovinen Serum und 12,5 µM CaCl₂, verhinderte eine weitere Verdauung durch die noch vorhandene Enzymaktivität. Das Debris wurde für einige Minuten der Sedimentation durch die Schwerkraft überlassen. Der Überstand, welcher die intakten Kardiomyozyten enthielt, wurde zentrifugiert (1 Minute bei 180 x g). Das entstandene Pellet wurde in frischem Perfusionspuffer resuspendiert, welcher zusätzlich 5% fetales bovines Serum und 12,5 µM CaCl₂ enthielt.

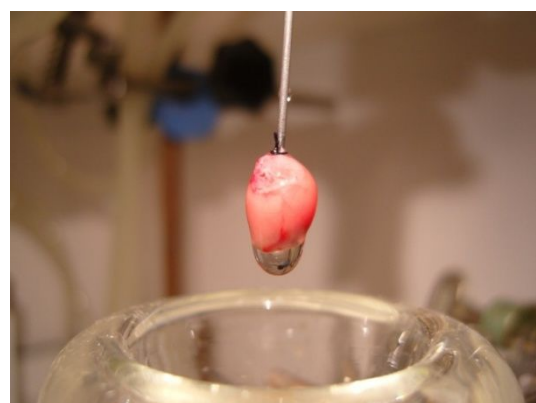
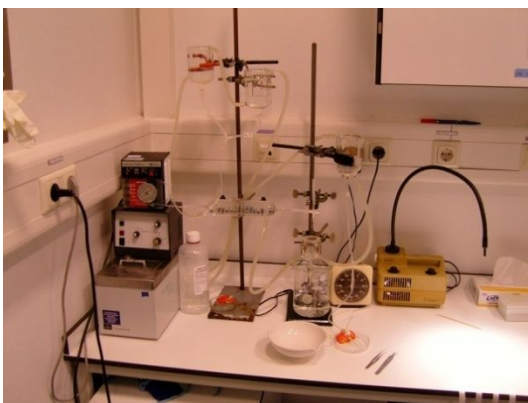


Abb. 2.1 Perfusionssystem im Tier-OP und adultes Mauserz im System

Die schrittweise Erhöhung der Kalziumkonzentration durch Hinzugabe von CaCl_2 ($12.5 \mu\text{M} \rightarrow 62 \mu\text{M} \rightarrow 112 \mu\text{M} \rightarrow 212 \mu\text{M} \rightarrow 500 \mu\text{M} \rightarrow 1\text{mM}$), gewährleistete eine langsame und schonende Rekalzifizierung der Zellen.

Anschließend wurden die Kardiomyozyten in mehreren Schritten gewaschen und im IonOptix Puffer (in mM: 135 NaCl, 4,7 KCl, 0,6 KH_2PO_4 , 0,6 Na_2HPO_4 , 1,2 MgSO_4 , 10 HEPES (pH 7,46), 1,25 CaCl_2 , 20 Glukose) verdünnt.

2.3 IonOptix System – Akquisition und Analyse

Mit Hilfe des IonOptix Systems (IonOptix Corporation, Milton, MA, USA) (Abb. 2.2) war es möglich die Kontraktilität und die Kalziumströme von stimulierten Kardiomyozyten simultan aufzuzeichnen. Die anschließende Analyse der Daten wurde mit der Software IonWizard 5.0 (IonOptix Corporation, Milton, MA, USA) durchgeführt, welche auch zur Aufzeichnung der Daten diente.

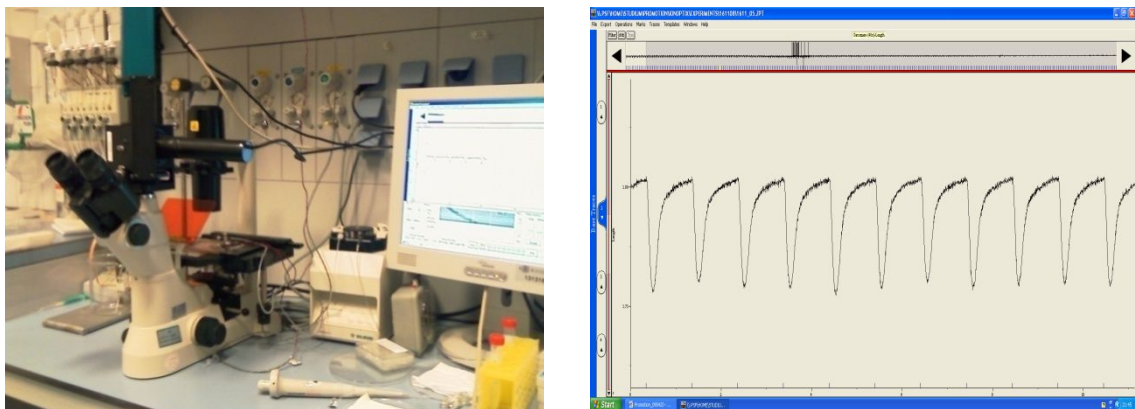


Abb. 2.2 IonOptix: ein Mehr-Komponenten System zur simultanen Aufzeichnung von Kontraktilität und Kalziumströmen in stimulierten Kardiomyozyten

2.3.1 Versuchsaufbau

Bevor die eigentliche Messung im IonOptix System beginnen konnte, mussten die isolierten Kardiomyozyten in IonOptix Puffer auf ca. 10.000 - 15.000 Zellen pro ml verdünnt werden. Dieser Schritt war notwendig, damit sich die einzelnen Zellen in der Messzelle (Cell MicroControls, Norfolk, VA, USA) ohne gegenseitige Überlagerung verteilen konnten. Die Messzelle wurde mit 400 μl der Zell-

suspension beladen und anschließend auf dem Objektisch eines invertierten Mikroskopes (Nikon Eclipse TS 100) befestigt. Die Stimulation der Kardiomyozyten wurde durch zwei Iridiumelektroden, welche mit einem Feldstimulator (MyoPacer, IonOptix Corporation, Milton, MA, USA) verbunden waren, gewährleistet. Somit war es möglich, die Zellen mit einer Frequenz von 1 Hz bei 10 V und 4 ms Pulsdauer zu erregen. Alle Versuche mit dem IonOptix System wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Folgende Kriterien wurden für die Auswahl einer zu vermessenden Zelle festgelegt:

- 1) stabförmige Zellen mit einem klaren gestreiften Muster
- 2) keine sichtbaren Membranschäden oder Bläschen in der Membran
- 3) keine hyperkontraktilen Zonen oder Zonen mit Spontankontraktionen
- 4) eine stabile Kontraktionsamplitude

2.3.2 Funktionsweise der Sarkomerlängenmessung

Die dünnen Aktinfilamente und die dicken Myosinfilamente sind im Skelett- und Herzmuskel so organisiert, dass sie auf Grund ihrer verschiedenen optischen Eigenschaften unter dem Lichtmikroskop eine charakteristische Bandenstreifung aufweisen. Die aufeinanderfolgenden hellen und dunklen Banden mehrerer sog. Sarkomere ergeben bei der Analyse der optischen Dichte sinusförmige Kurven. Die Wellenlänge der Sinuskurve repräsentiert die Sarkomerlänge. Bei den Versuchen wurde diese optische Dichte von einer Kamera (IonOptix MyoCamTM, IonOptix Corporation, Milton, MA, USA) aufgezeichnet, welche anschließend durch die IonWizard 5.0 Software mit Hilfe eines sog. Fast Fourier Transform (FFT) in die entsprechende Sarkomerlänge umgerechnet wurde. Die Kamera erlaubte mit einer Bildfrequenz von 240 Hz die präzise Wahrnehmung der Kontraktion. Während der Aufzeichnung der Sarkomerlänge gegen die Zeit wurden die für die spätere Analyse notwendigen Stimulationsmarkierungen si-

multan registriert. Für die Analyse der Daten wurde die IonWizard 5.0 Software genutzt, welche eine effiziente Auswertung von 20 - 40 Kontraktionen zu Mittelwerten zahlreicher Kurvenparameter möglich machte.

2.3.3 Kurvenparameter der Sarkomerlängenmessung

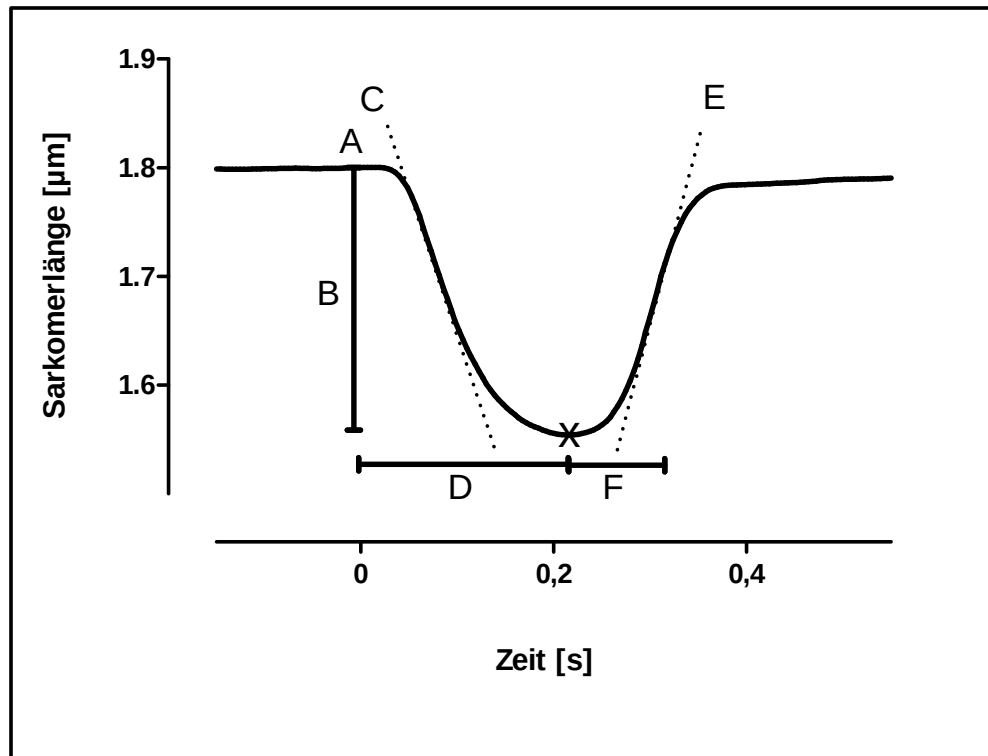


Abb. 2.4 Kurvenparameter der Sarkomerlängenmessung

Basislinie (A):	Sarkomerlänge vor der Stimulation
Amplitudenhöhe (B):	Wert der maximalen Auslenkung der Kurve ausgehend von der basalen Sarkomerlänge während einer Kontraktion
% Amplitudenhöhe:	Wert der Amplitudenhöhe in % der Basislinie ausgedrückt
Geschwindigkeit der Kontraktion (C):	Wert der größten Steigung während einer Kontraktionsphase. Da die Kontraktion eine Verkürzung der Sarkomer-

länge mit sich bringt, ist dieser Wert immer negativ; Je kleiner der Wert, desto größer die Geschwindigkeit

Zeit bis zur max. Kontraktion (D): Zeit bis zum Erreichen der maximalen Amplitude (X) während einer Kontraktion, ausgehend von der Stimulation

Geschwindigkeit der Entspannung (E): Wert der größten Steigung während einer Entspannungsphase. Da die Entspannung eine Vergrößerung der Sarkomerlänge mit sich zieht, ist dieser Wert immer positiv; Je größer der Wert, desto größer die Geschwindigkeit

Zeit bis zur 50 % Entspannung (F): Zeit während der Entspannungsphase bis zum Erreichen von 50 % der maximalen Auslenkung, ausgehend vom Zeitpunkt der größten Kontraktion (X)

2.3.4 Messung der intrazellulären Kalziumströme mit Fura-2

Das IonOptix System ermöglichte eine gleichzeitige Messung der intrazellulären Kalziumströme, zusätzlich zu der Messung der Sarkomerlängen. Hierzu wurden die Zellen mit dem fluoreszierenden Kalziumchelator Fura-2 beladen. Da Fura-2 nicht in der Lage ist, die Zellmembran zu durchdringen, wurde der Acetoxymethylester von Fura-2, Fura-2 AM (Abb. 2.5) genutzt. Fura-2 AM kann jedoch keine Verbindung mit Kalziumionen eingehen, solange die lipophilen Gruppen anheften. Um diese zu entfernen, macht man sich die intrazellulär vorhandenen unspezifischen Phosphodiesterasen zu nutze. Die lipophilen Gruppen werden

entfernt und Fura-2 wird intrazellulär angereichert, da es nun nicht mehr membranängig ist. Die Zellen wurden für 30 Minuten 1 μM Fura-2 AM ausgesetzt und anschließend zwei Mal gewaschen, um extrazelluläre AM Ester zu entfernen. Weitere 30 Minuten Inkubationszeit stellten eine vollständige Entfernung verbliebener lipophiler Gruppen sicher.

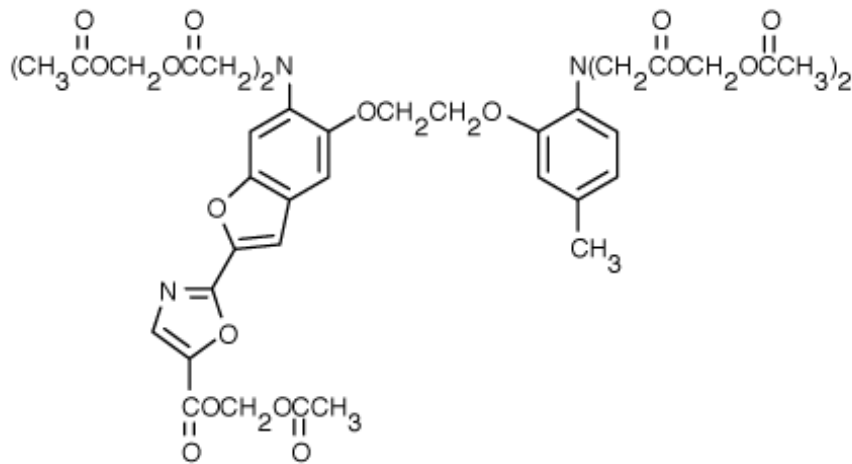


Abb. 2.5 Fura-2 AM (Quelle: Invitrogen Website)

Dieser spezifisch an Kalzium bindende Chelator fluoresziert unter Anregung durch UV-Licht. Je nach freiem oder an Kalzium gebundenen Vorliegen, verändert sich das Maximum im Anregungsspektrum (Abb. 2.6). Im gebundenen Zustand liegt das Maximum des Anregungsspektrums bei 340 nm, im freien Zustand bei 380 nm. Das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten zwischen der Anregung durch UV-Licht der Wellenlänge 340 nm oder 380 nm, spiegelt somit die intrazelluläre Kalziumkonzentration wieder.

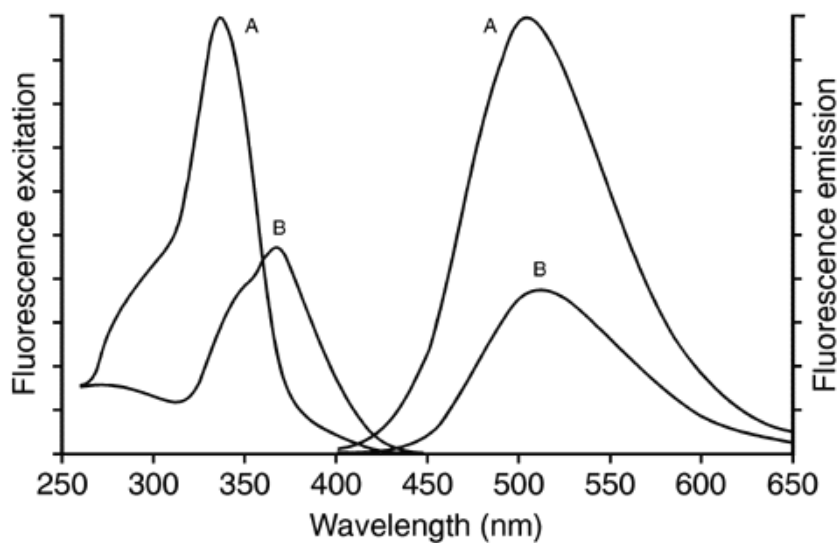


Abb. 2.6 Maximum des Anregungsspektrum von Fura-2 bei (A) 340 nm und (B) 380 nm; Maximum des Emmisionsspektrums bei 510 nm (Quelle: Invitrogen Website)

Um die für die Kalziumströme benötigte, hohe zeitliche Auflösung zu erreichen, wurde das IonOptix HyperSwitch Dual Excitation Light Source (IonOptix Corporation, Milton, MA, USA) als UV-Lichtquelle verwendet. Dieses ermöglicht einen Wellenlängenwechsel in einer Zeit von unter 400 μ s und somit 250 Wellenlängenpaare pro Sekunde. Das Licht einer 75 W Xenonlampe wird von einem Parabolspiegel zu einem konvergierenden Strahl geformt. Ein weiterer Spiegel positioniert den Fokuspunkt des Strahls direkt hinter einem durch ein Galvanometer angetriebenen Spiegel, welcher in hoher Geschwindigkeit zwischen zwei Pfaden alterniert. Auf Pfad 2 (Abb. 2.7 grün) wird das nun divergierende Xenonlicht von einer Quarzlinse gesammelt und in den „Vordereingang“ des sog. Excitation Dichroic Cube (EDC) geleitet. Auf Pfad 1 (Abb. 2.7 blau) wird das Licht zusätzlich durch eine zweite Linse gesammelt und dann in den „Seiteneingang“ des EDC gesteuert. Für beide Eingänge existiert ein eigener Filter, welcher die jeweilige Wellenlänge des Xenonlichts bestimmt. Durch den Kaltlichtspiegel im EDC werden beide Strahlen durch den selben Ausgang geleitet. Der Ausgang wird am Ende eines Flüssiglichtleiters fokussiert. Am anderen Ende dieses

Flüssiglichtleiters befindet sich eine Mikroskopkupplung, welche das UV-Licht in das mit dem zu untersuchenden Objekt bestückte Mikroskop leitet.

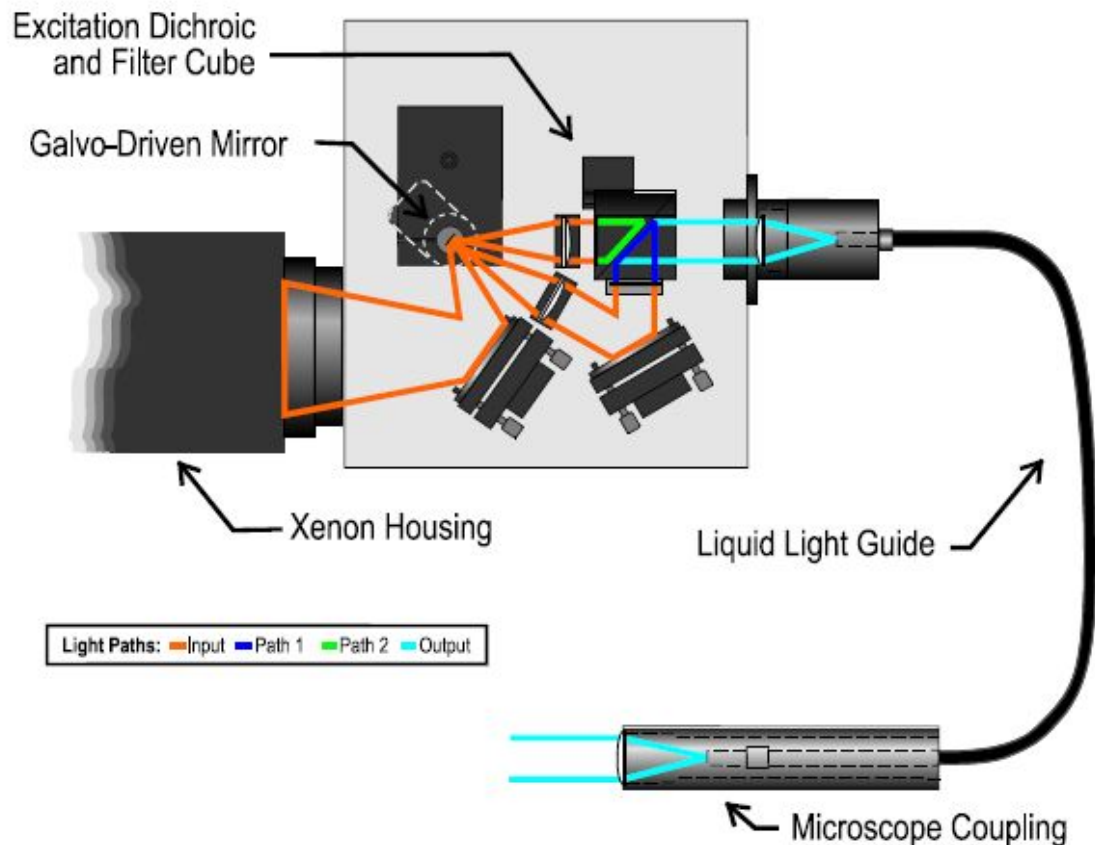


Abb. 2.7 IonOptix HyperSwitch Dual Excitation Light Source (Quelle: Broschüre IonOptix Corp.)

Um das von Fura-2 emittierte Licht zu messen, wurde ein Photo Multiplier Tube (PMT) genutzt, welcher jedes von einem Kaltlichtspiegel eingeleitete Photon in einen Strom umwandelt. Licht von längerer Wellenlänge durchquert den Kaltlichtspiegel und gelangt zur Kamera (MyoCam™, IonOptix Corporation, Milton, MA, USA). Dies ermöglichte die gleichzeitige Messung der Fluoreszenzintensitäten und Sarkomerlängen (Abb. 2.8). Die IonOptix Software errechnet das Verhältnis zwischen den Fluoreszenzintensitäten bei 340 nm und 380 nm Wellenlänge und stellt diese graphisch als eine Funktion gegen die Zeit dar. Die Stimulationsmarken für die spätere Analyse werden ebenfalls aufgezeichnet.

Für die Analyse der Daten wurde die IonWizard 5.0 Software genutzt, die eine effiziente Auswertung von 20 - 40 Kalziumströmen zu Mittelwerten zahlreicher Kurvenparameter möglich machte.

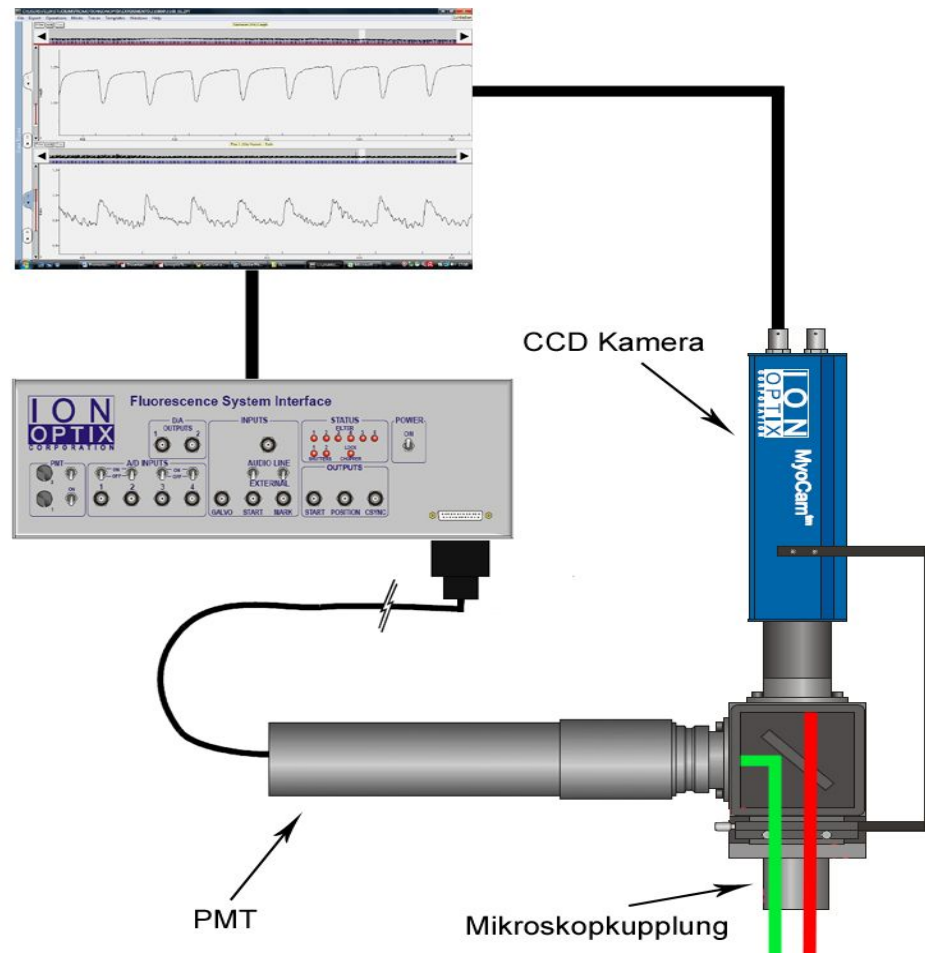


Abb. 2.8 Aufbau des IonOptix Systems zur gleichzeitigen Messung von Sarkomerlängen (rot) und Kalziumströmen (grün) (Quelle: Grafiken zum Teil aus Broschüre IonOptix Corp.)

2.3.5 Kurvenparameter der Kalziumströme

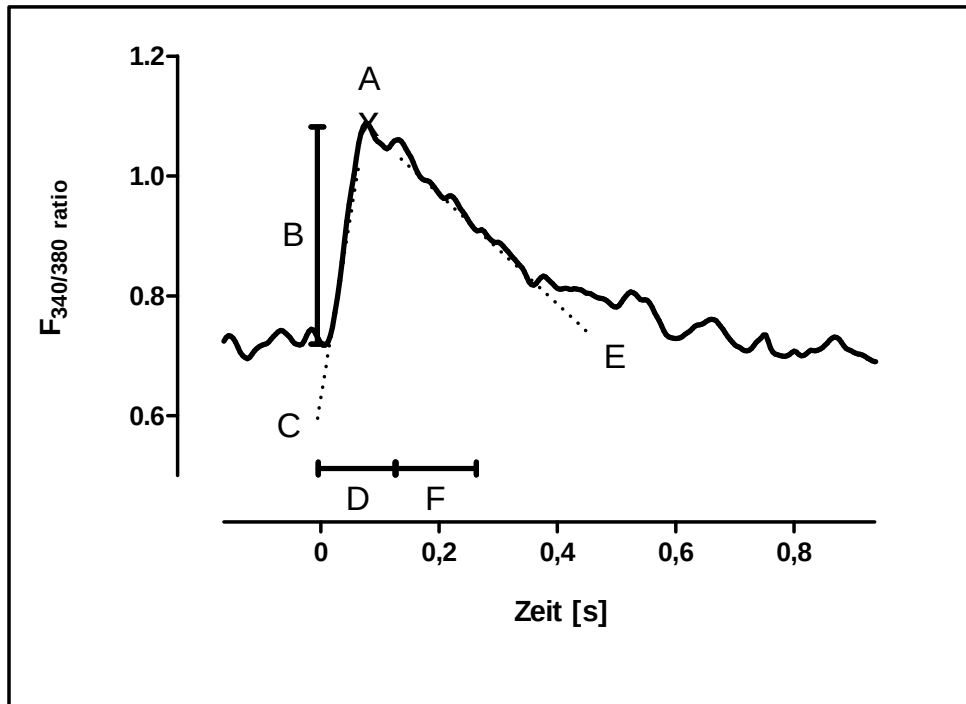


Abb. 2.9 Kurvenparameter Kalziumstrommessung

Diastolische Kalziumkonzentration (A):

Wert des Fluoreszenzverhältnisses vor der Stimulation

Amplitudenhöhe (B):

Wert der maximalen Auslenkung der Kurve, ausgehend von der Basislinie während einer Kontraktion

% Amplitudenhöhe:

Wert der Amplitudenhöhe in % der Basislinie ausgedrückt

Geschwindigkeit des
Kalziumanstiegs (C):

Wert der größten Steigung während einer Kontraktionsphase. Da der Kontraktion des Herzmuskels eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration vorausgeht, ist dieser Wert immer positiv; Je größer der Wert, desto größer die Geschwindigkeit

Zeit bis zur max. Kalzium-
konzentration (D):

Zeit bis zum Erreichen der maximalen Amplitude (X) während einer Kontraktion des Herzmuskels, ausgehend von der Stimulation

Geschwindigkeit des Kalzium-
Rückflusses (E):

Wert der kleinsten Steigung während einer Entspannungsphase. Da der Entspannung des Herzmuskels eine Erniedrigung der Kalziumkonzentration vorausgeht, ist dieser Wert immer negativ. Je kleiner der Wert, desto größer die Geschwindigkeit

Zeit bis zu 50 % des Kalzium-
rückflusses (F):

Zeit bis zum Erreichen von 50 % der maximalen Kalziumamplitude während der Entspannungsphase des Herzmuskels, ausgehend vom Zeitpunkt der größten Kalziumkonzentration (X)

2.4 Kontraktilitätsmessung am intakten Langendorff-perfundierten Herz

Die Herzen wurden entsprechend der Extraktion der Kardiomyozyten (s. 2.2) präpariert und durch die Aorta kanüliert. Bei der Präparation war darauf zu achten, die Strukturen, die für die Eigenregulation des Herzens verantwortlich sind, nicht zu zerstören. Das Herz wurde anschließend in ein temperiertes (37°C) Langendorff-Perfusionssystem integriert und mit einer Tyrode Lösung (in mM: 119,8 NaCl, 5,4 KCl, 1,8 CaCl₂, 1,05 MgCl₂, 0,42 NaH₂PO₄, 22,6 NaHCO₃, 10 Glukose, 0,5 Ascorbinsäure, 0,05 Na₂EDTA, 5 Pyruvatsäure) perfundiert. Die Lösung wurde vor Eintritt in das System kontinuierlich mit 95% O₂ und 5% CO₂ begast und über eine 100 mm Wassersäule mit konstantem Druck in die Koronargefäße des Herzens geleitet. Die Herzspitze wurde mit einem Clip versehen, welcher über einen Kraftumwandler (Ingenieurbüro Jäckel, Hanau, Deutschland) die Messung (BMON Software, Ingenieurberü Jäckel, Hanau, Deutschland) der isometrischen Kontraktionskraft des Herzmuskels ermöglichte. Vor dem Start der Messung wurden die Herzen ca. 30 Minuten kontinuierlich perfundiert, bis sich eine konstante Amplitude eingestellt hatte. Die Qualität des Herzmuskels wurde durch Zugabe von 1 µM Isoprenalin überprüft. Nach einem anschließenden Waschvorgang wurde NCA in aufsteigenden Konzentrationen (2 µM → 7 µM → 15 µM) hinzugefügt.

2.5 HNO Donator „NCA“

Um die pharmakologischen Eigenschaften von Nitroxyl im Versuch überprüfen zu können, wurde ein Donator benötigt, welcher das gering metastabile Molekül in einer physiologischen Umgebung zur Verfügung stellt. Das „NCA“ wird von den King Laboratories in den USA synthetisiert und gehört zur Gruppe der Acyloxy Nitroso Compounds. Das Molekulargewicht ist 171,19 g/mol. Die Bildung von HNO läuft über eine Hydrolyse des Moleküls (Abb. 2.10) und produziert als Nebenprodukt Essigsäure und einen Ketonrest. In DMSO gelöst, ist der Donator stabil und setzt kein HNO frei. Im Gegensatz zu Angeli's Salz geht die Freisetzung von HNO unter Phosphatpufferumgebung kontinuierlich vonstatten.

Die Freisetzungsrates hängt streng von der Pufferumgebung ab. In Phosphatpuffer (pH 7,4) gelöst, gibt der Donator bei Raumtemperatur und zwei Stunden Inkubationszeit 28 % des freizusetzenden HNO ab (22). Die freigesetzte Menge wird bei gleichen Versuchsbedingungen auf mehr als das Doppelte gesteigert, wenn als Lösungsmittel Methanol plus 0,1 M NaOH genutzt wird.

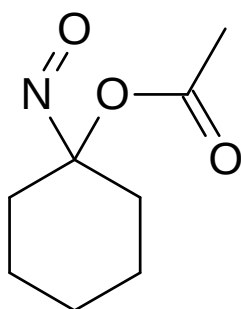


Abb. 2.10 Strukturformel von NCA

NCA ist lichtempfindlich und muss bei -20°C gelagert werden. Die tiefblaue Farbe und der stechende Geruch sind wichtige Indikatoren für die Unversehrtheit des Donators. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren der Stammlösung führt zu Qualitätseinbußen und wurde durch Aliquotieren vermieden. 5 μL der gelieferten Stammlösung wurden in 15 μL DMSO gelöst und bis zum Versuch bei -20° gelagert. Aus dieser 500 mM Lösung wurden vor Beginn des Versuchs die entsprechenden Verdünnungen vorgenommen, um die gewünschte Konzentration während des Versuchs erreichen zu können. Während des gesamten Versuchs wurde der Donator auf Eis gelagert und vor Licht geschützt. Wegen der langsamen Freisetzungskinetik war es möglich, die weiteren Verdünnungen in dem für den Versuch benötigten Phosphatpuffer durchzuführen. Somit konnte die endgültige Konzentration von DMSO, im Hinblick auf die Aussagekraft des Experiments, deutlich gesenkt werden (Endkonzentration DMSO: 0,2 mM).

2.6 HPLC Analyse der Reaktion von NCA mit Glutathion

Mit Hilfe der High Performance Liquid Chromatography (HPLC) konnte die Kinetik der Reaktion von NCA mit dem Thiol Glutathion (GSH) *in vitro* untersucht werden. Hierzu wurden Standards von den Einzelkomponenten, sowie Proben verschiedener Zusammensetzungen und mit unterschiedlichen Inkubationszeiten in ein HPLC System injiziert. Die Proben wurden auf Basis eines Phosphatpuffers (PBS: 138 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH_2PO_4 , 8,1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$; pH 7,4) hergestellt. Das System besteht aus einem Pumpenaggregat (P680 HPLC Pump, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA) mit zwei Pumpen, einem externen Degasser (Degasys DG-1210, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA), einem temperaturkontrollierten Autosampler (ASI-100 Automated Sample Injector, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA), einem Temperatur-kontrollierten Säulenofen (STH 585, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA) und einer UV-Messanlage (UVD340U, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA). Dazu gehört ein PC-System mit der Chromeleon Software (Chromeleon Client 6.60, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA), welche eine genaue Überwachung des Systemzustandes, die Aufzeichnung der Daten und die Remotesteuerung der Anlage ermöglicht. Im Autosampler wurden die Proben während des gesamten Versuchs auf 4°C temperiert, um eine über die Inkubationszeit andauernde Reaktivität der Probenbestandteile weitgehend zu verhindern. Die Proben wurden mit einer Kromasil C-18 Säule (250 x 4,6 mm, 5 µm Partikelgröße; Phenomenex, St.Torrance, CA, USA) und einem Stufengradienten von Puffer A (10 mM Tetrabutylammoniumhydroxid, 10 mM KH_2PO_4 und 0,25% Methanol, pH 7,00) zu Puffer B (2,8 mM Tetrabutylammoniumhydroxid, 100 mM KH_2PO_4 und 30% Methanol, pH 5,50) wie folgend fraktioniert: 10 Minuten 100% Puffer A, 3 Minuten Gradient auf 80% Puffer A, 10 min Gradient auf 70% Puffer A, 12 Minuten Gradient auf 55% Puffer A. Die Flussrate betrug 1,2 ml pro Minute. Der Säulenofen wurde während des Versuchs auf 18°C temperiert. Das Injektionsvolumen betrug 250 µl pro Probe.

Die Probe wurde mit Hilfe der UV-Lampe und des UV-Detektorsystems bei 206 und 208 nm für 40 Minuten gemessen. Die anschließende Analyse der aufgezeichneten Daten wurde ebenfalls mit der Chromeleon Software durchgeführt.

2.7 Statistische Analyse

Die statistische Analyse der aufgezeichneten Daten wurde mit Hilfe der Graph-Pad Prism 5.0 Software durchgeführt. Bei einem Vergleich von Messergebnissen vor und nach der Zugabe der zu untersuchenden Substanz wurde der Student t-test herangezogen. Ein P Wert von <0.05 wurde als statistisch signifikant angesehen. Alle angegebenen Messwerte sind Mittelwerte $\pm$ SEM.

2.8 Liste der Chemikalien

Angeli's Salz, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA

Aqua ad injectabilia, Baxter, Unterschleißheim

L-Ascorbinsäure, Merck, Darmstadt

2,3-Butandionmonoxim (BDM), Sigma-Aldrich, Steinheim

Kalziumchlorid Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$), Sigma-Aldrich, Steinheim

Dimethylsulfoxid (DMSO), Merck, Darmstadt

Ethanol (96%), denaturiert, Merck, Darmstadt

Fetal calf serum (FCS), Invitrogen/Gibco®, Karlsruhe

Fura-2 AM, Invitrogen/Molecular Probes™, Karlsruhe

D-(+)-Glukose Monohydrat, Merck, Darmstadt

4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethanschwefelsäure (HEPES), Carl Roth, Karlsruhe

Salzsäure, 37% solution, Merck, Darmstadt

Liberase Blendzyme 3, Roche Diagnostics, Mannheim

Magnesiumchlorid Hexahydrat ($\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$), Merck, Darmstadt

Magnesiumsulfat Heptahydrat ($\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$), Merck, Darmstadt

Methanol, Merck, Darmstadt

NCA, hergestellt von Prof. S. Bruce King, Wake Forest University, Winston-Salem, NC, USA

Kaliumchlorid (KCl), Merck, Darmstadt

Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4), Merck, Darmstadt

Kaliumhydrogenkarbonat (KHCO_3), Merck, Darmstadt

Phosphat-gepufferte Saline (PBS), Biochrom AG, Berlin

Pyruvatsäure, Sigma-Aldrich, Steinheim

Natriumhydrogenkarbonat (NaHCO_3), Merck, Darmstadt

Natriumchlorid (NaCl), Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande

Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$), Merck, Darmstadt

Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4), Merck, Darmstadt

Natriumhydroxid (NaOH), Merck, Darmstadt

Taurin, Merck, Darmstadt

Tetrabutylammoniumhydroxid, Nova Chimica, Mailand, Italien

2.9 Liste der Laborgeräte

Accu jet® Pipettierhilfe, Brand, Wertheim

Analytische Waage, Sartorius, Göttingen

Arc lamp power supply, Cairn Research, Faversham, Kent, UK

Autosampler ASI-100, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA

Degasser Degasys DG-1210, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA

Kühlzentrifuge 5415 R, Eppendorf, Hamburg

Kühlzentrifuge Universal 30 RF, Hettich, Tuttlingen

Fluorescence System Interface, IonOptix Corporation, Milton, MA, USA

HyperSwitch high intensity arc lamp, IonOptix Corporation, Milton, MA, USA

Kraftumwandler, Ingenieurbüro Jäckel, Hanau

Langendorff-Perfusionssystem, Eigenproduktion

Magnetrührer, Heidolph, Schwabach

Milli-Q Plus Reinstwasseranlage, Millipore, Schwalbach

MyoCam, IonOptix Corporation, Milton, MA, USA

MyoPacer field simulator, IonOptix Corporation, Milton, MA, USA

Nikon Eclipse TS 100 inverse microscope, Nikon, Düsseldorf

Peristaltische Pumpe, Pharmacia, Freiburg i.Br.

Pumpensystem P680, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA

pH Meter, Knick, Berlin

SmartSpec Spectrophotometer, Bio-Rad, München

Pipetten Reference, 0.5-10 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL, Eppendorf, Hamburg

Präzisionswaage CP225D, Sartorius, Göttingen

Säulenofen STH 585, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA

Stimulation/Thermistor assay, CellMicroControls, Norfolk, VA, USA

Stimulationszelle für Myozyten, CellMicroControls, Norfolk, VA, USA

Stimulationzellenhalterung, CellMicroControls, Norfolk, VA, USA

Thermostat, CellMicroControls, Norfolk, VA, USA

Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg

UV-Messanlage UVD340U, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA

Videopower, IonOptix Corporation, Milton, MA, USA

Vortex Reax top, Heidolph, Schwabach

Wasserbad, GFL, Burgwedel

2.10 Liste der Verbrauchsmaterialien

Zentrifugierröhrchen, 15 ml, 50 ml, Sarstedt, Nümbrecht

Sterican® Einwegkanülen, B. Braun, Melsungen

Einwegspritzen, B. Braun, Melsungen

Insulinspritzen, Becton Dickinson, Heidelberg

Petrischalen, 10 mm, Sarstedt, Nümbrecht

Pipettenspitzen, 10 µl, 100 µl, 1000 µl, Sarstedt, Nümbrecht

Küvetten, Sarstedt, Nümbrecht

Reaktionsgefäße, 1.5 ml, 2ml, Eppendorf, Hamburg

Serologische Pipetten, 5 ml, 10 ml, 10 ml mit weiter Öffnung, 25 ml, Sarstedt, Nümbrecht

3 Ergebnisse

3.1 Wirkung von *NCA* auf die Sarkomerlänge

Zu Beginn wurden die Auswirkungen des Donators *NCA* auf die Sarkomerlänge der isolierten Kardiomyozyten untersucht. Hierzu wurden bei Stimulation mit 1 Hz und 10 mV die Sarkomerlängen einer Zelle aufgezeichnet. Nach kurzer Zeit wurde der Donator in verschiedenen Konzentrationen hinzugegeben. Abbildung 3.1 zeigt die Messkurve einer Sarkomerlängenmessung, die den generellen Ablauf einer HNO-bedingten positiven Inotropie darstellt. Ohne *NCA* zeigt sich eine nur moderate Verkürzung der Sarkomere. Auf die Hinzugabe von 45 μM Donator folgt nach kurzer Zeit eine geringe negative Inotropie, gefolgt von einem starken Anstieg der Kontraktilität. Gleichzeitig sinkt häufig die diastolische Sarkomerlänge, was einer gesteigerten Vorspannung entspricht, bzw. eine verminderte Fähigkeit zur Entspannung darstellt. Ohne Waschen schwächt sich der Effekt nach einiger Zeit wieder ab und kehrt auf eine moderate Kontraktilität zurück. Allerdings bleibt die diastolische Vorspannung meist erhalten, die Kurve ist nach unten verschoben.

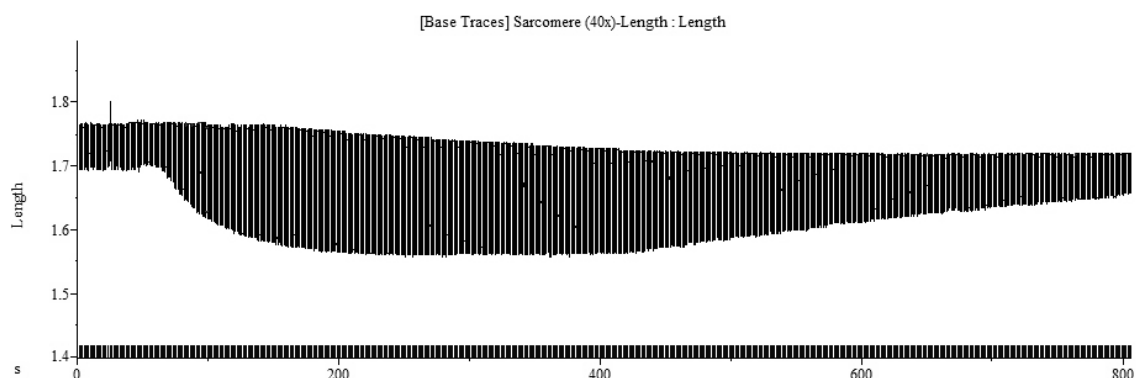


Abb. 3.1 Messkurve einer Sarkomerlängenmessung einer stimulierten (1 Hz / 10 mV) Herzmuskelzelle unter Einfluß von 45 μM *NCA* (Screenshot SarcLen Acquisition Software)

3.1.1 Herstellung einer Dosis-Wirkungs-Beziehung

Da für den Donator *NCA* im Einsatz an isolierten Kardiomyozyten keine Konzentrationsangaben vorlagen, musste zuerst eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt werden. Bei einer Konzentration von 7,5 μM des Donators konnte eine erste minimale positive Inotropie festgestellt werden. Anschließend wurde von 7,5 μM ausgehend die Konzentration in Schritten, bis zur toxischen Wirkung für die Zelle, erhöht. Abbildung 3.2 zeigt die Dosis-Wirkungs-Beziehung von *NCA* an isolierten Kardiomyozyten.

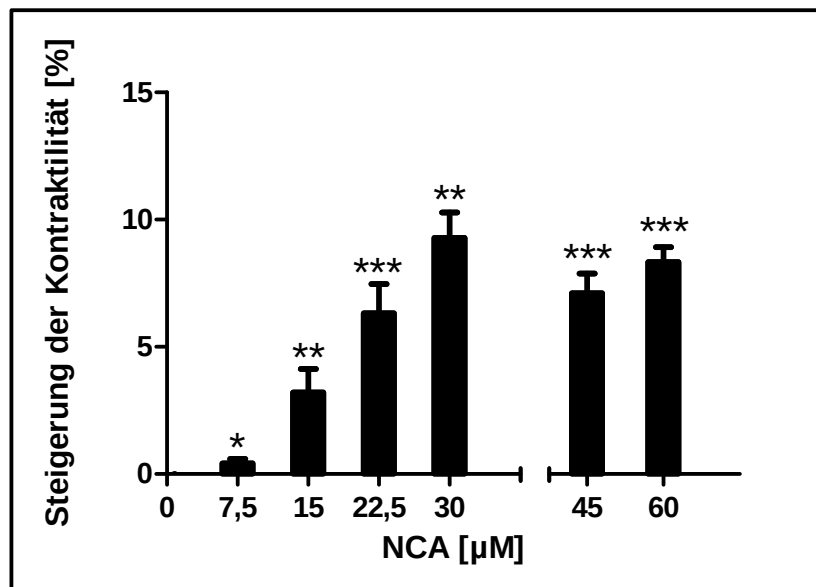


Abb. 3.2 Dosis-Wirkungs-Beziehung von *NCA* auf die Sarkomerlänge von stimulierten (1 Hz / 10 mV) Kardiomyozyten. Werte sind als Mittelwerte $\pm$ SEM angegeben. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs. basal; Student's *t*-test.

Eine Konzentration von 45 μM wurde als Standardkonzentration für die folgenden Versuche gewählt. Es konnten mit anderen Konzentrationen etwas größere Werte für die Sarkomerlängenverkürzung gemessen werden, allerdings war die Anzahl der Zellen, die eine zuverlässige Antwort auf den Donator gaben, zu niedrig. Die Konzentration 45 μM stellt somit einen Kompromiss zwischen maximaler Antwort der Zelle und maximaler Verträglichkeit und Zuverlässigkeit dar.

3.1.2 Veränderung der Kontraktionskurvenparameter

Mit 45 μM NCA verlängerte sich die Zeitspanne zwischen Stimulation der Zelle und der maximalen Amplitude einer Kontraktion von basal $21,13 \pm 1,35$ ms auf $30,08 \pm 2,09$ ms ($p=0,0015$). Dies entspricht einer Verlängerung von 42 %. Gleichzeitig erhöhte sich die Geschwindigkeit der Kontraktion von $-2,00 \pm 0,49$ $\mu\text{m/s}$ auf $-3,61 \pm 0,53$ $\mu\text{m/s}$ ($p=0,0001$), entsprechend einer Steigerung von 80 %.

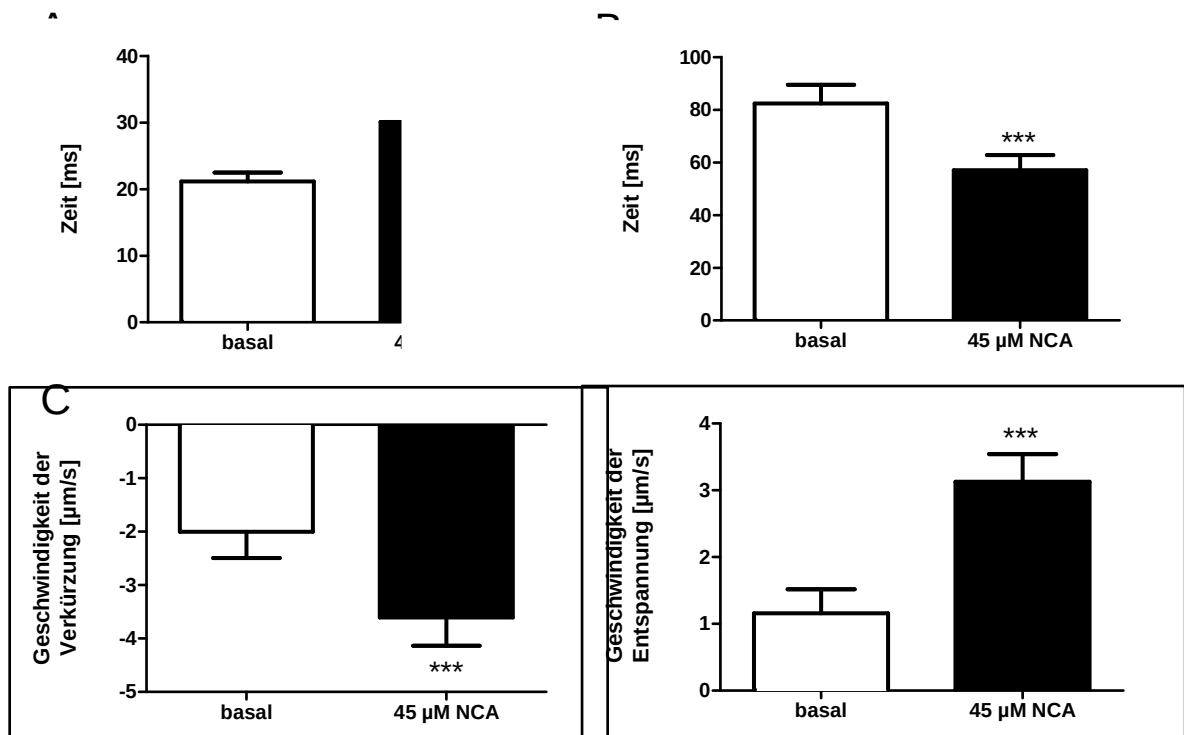


Abb. 3.3 Zusammenfassung veränderter Kurvenparameter der Sarkomerlängenmessung von stimulierten (1 Hz / 10 mV) Kardiomyozyten: (A) Zeit zwischen Zellstimulation und maximaler Kontraktion; (B) Zeit zwischen maximaler Kontraktion und halbmaximaler Kontraktion; (C) Geschwindigkeit der Kontraktion; (D) Geschwindigkeit der Entspannung. Werte sind als Mittelwerte $\pm$ SEM angegeben. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs. basal; Student's t-test.

Die Zeit zwischen zwei Kontraktionen blieb jedoch unverändert, da sich die Zeitspanne zwischen maximaler Amplitude und halbmaximaler Entspannung

von $82,39 \pm 7,09$ ms auf $57,06 \pm 5,71$ ms verringerte ($p=0,0008$). Dies entspricht einer Verringerung der Zeitspanne um 69 %. Die Geschwindigkeit der Entspannung verdreifacht sich von $1,16 \pm 0,36$ $\mu\text{m/s}$ auf $3,13 \pm 0,41$ $\mu\text{m/s}$ ($P<0.0001$). Abbildung 3.3 zeigt zusammengefasst die Veränderungen der Parameter der Kontraktionskurven unter Einfluss von *NCA*.

3.2 Wirkungen von *NCA* auf die intrazelluläre Kalziumionenzirkulation

Die Kalziumtransientenmessungen wurden an isolierten Kardiomyozyten mit Hilfe des Kalziumionenmarkers Fura-2 AM simultan zu den Sarkomerlängenmessungen durchgeführt. Auf ein intrazelluläres Kalziummaximum folgt mit kurzer Verzögerung ein Kontraktionsmaximum der Sarkomere. Eine Erhöhung der Kontraktilität ging mit einer Erhöhung der Kalziumionenzirkulation einher. Abbildung 3.4 zeigt diese Abhängigkeit. Nach Hinzugabe von *NCA* verschob sich die gesamte Kurve der Kalziumströme nach oben. Dies entspricht einer erhöhten basalen Konzentration von Kalziumionen im Zytoplasma.

3.2.1 Veränderung der Kurvenparameter der Kalziumtransienten

Die $F_{340/380}$ ratio stellt die sich außerhalb des Sarkoplasmatischen Retikulums befindende Kalziumionenmenge dar. Diese erhöhte sich, wie in Abbildung 3.5 deutlich wird, unter Einfluss von $45 \mu\text{M}$ *NCA* von $0,052 \pm 0,019$ auf $0,082 \pm 0,029$ ($p=0,0427$), entsprechend 58 %. Gleichzeitig wurde die Zeitspanne zwischen der Stimulation und dem Erreichen des Amplitudenmaximums von $50,18 \pm 8,17$ ms auf $68,22 \pm 9,48$ ms verlängert ($p=0,0270$) – eine Steigerung von 36 %.

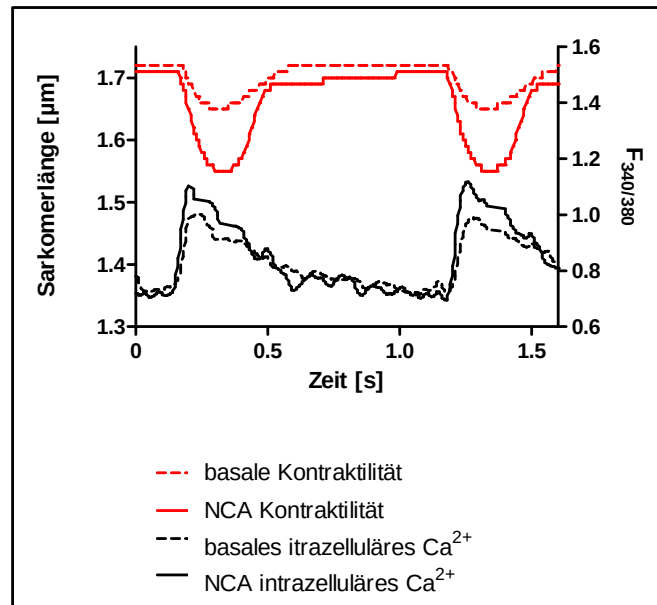
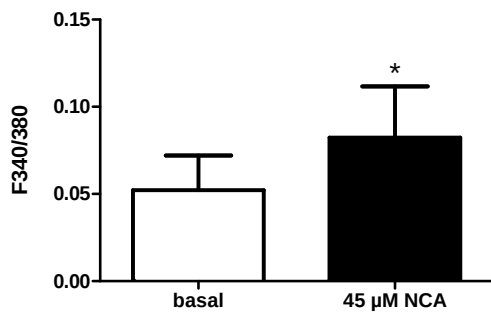


Abb. 3.4 Zeitliche Relation der Sarkomerlänge und des Kalziumtransienten unter Einfluß von 45 µM NCA

A



B

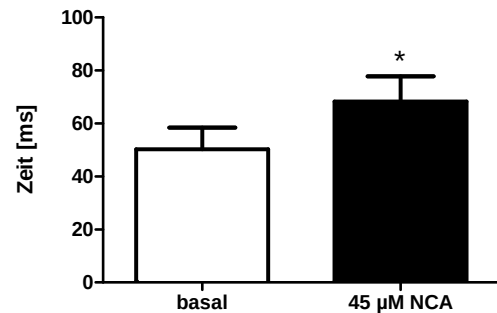


Abb. 3.5 Zusammenfassung veränderter Kurvenparameter der Kalziumtransientenmessung von stimulierten (1 Hz / 10 mV) Kardiomyozyten: (A) maximale Amplitude des Kalziumtransienten; (B) Zeit zwischen Zellstimulation und maximaler Amplitude. Werte sind als Mittelwerte ± SEM angegeben. * $P < 0,05$ vs. basal; Student's *t*-test.

3.3 Überprüfung der pharmakologisch wirksamen Substanz

Da bei dieser Untersuchung ein Donator eingesetzt wurde und somit nicht nur HNO als singuläres Molekül vorlag, war es nötig die eigentlich wirksame Substanz zu überprüfen. Hierzu wurde ein veränderter Donator (*NCA**) eingesetzt, dessen Bindung zum HNO-Molekül derart stark ist, dass eine Abspaltung unwahrscheinlich ist. Es konnte unter Einfluß von 45 μM *NCA** kein signifikanter Unterschied der Sarkomerlängenverkürzung festgestellt werden (Abb. 3.6).

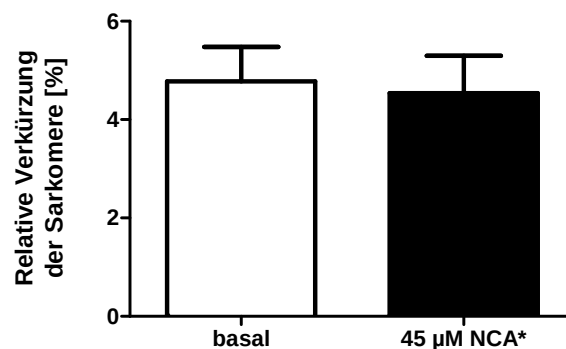
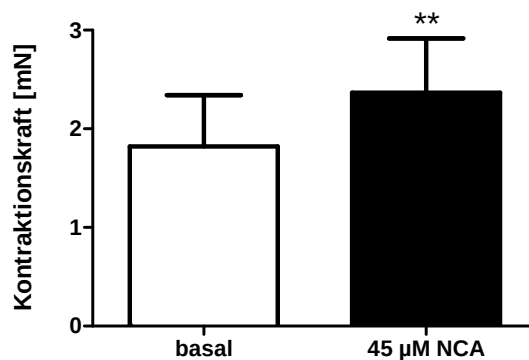


Abb. 3.6 Keine Veränderung der Sarkomerlängenverkürzung von stimulierten (1 Hz / 10 mV) Kardiomyozyten unter Einfluß von 45 μM *NCA**. Werte sind als Mittelwerte $\pm$ SEM angegeben. Nicht signifikant; $P > 0,05$ vs. basal; Student's *t*-test.

3.4 Wirkung von NCA auf die Kontraktionskraft von intakten Langendorff-perfundierten Mausherzen

Zur Überprüfung der Ergebnisse an isolierten Kardiomyozyten wurde die Kontraktionskraft von Langendorff-perfundierten, im Zellverbund intakten Mausherzen gemessen. Unter Einfluss von 45 μM *NCA* konnte auch unter diesen Versuchsbedingungen eine Steigerung der Kontraktionskraft von $1,82 \pm 0,52$ mN auf $2,37 \pm 0,55$ mN gemessen werden ($p = 0,0016$). Abbildung 3.7 zeigt diese Steigerung der Kontraktionskraft.



Einfluß von 45 µM NCA. Werte sind als Mittelwerte $\pm$ SEM angegeben.

*** $P < 0,005$ vs. basal; Student's *t*-test.*

3.5 Vergleich der Pharmakokinetik der HNO Donatoren

***Angeli's Salz* und NCA mittels HPLC**

Um die Reaktivität der beiden HNO Donatoren *Angeli's Salz* und NCA gegenüber deren bevorzugten Thiolen zu vergleichen, wurde die HPLC genutzt. Als Reaktionspartner wurde das Thiol Glutathion (GSH) in einer Konzentration von 100 µM benutzt. Die HNO Donatoren wurden in aufsteigenden Konzentrationen mit GSH inkubiert und dann vermessen. Auf Grund von technisch bedingt großen Schwankungen zwischen den in sich und untereinander plausiblen Messreihen werden hier als Abbildungen exemplarisch die Ergebnisse zweier einzelner Messreihen dargestellt. Diese Methode galt lediglich dem Nachweis, dass die Reaktion zwischen NCA und GSH keine Produktion von Sulfinamid nach sich zieht und somit, im Vergleich zu *Angeli's Salz*, einen anderen Reaktionsweg bevorzugt.

3.5.1 Produkte der Reaktion zwischen *Angeli's Salz* und Glutathion

Bei *Angeli's Salz*-Konzentrationen zwischen 1 nM und 100 nM konnte keine Abnahme der GSH-Konzentration festgestellt werden. Ab einer Konzentration von 1 µM nahm die GSH Konzentration, mit zunehmendem Reaktionspartner

Angeli's Salz, ab. Wie Abbildung 3.8 zeigt, verhielten sich die beiden Reaktionsprodukte GSSG, das GSH-Dimer und Sulfinamid gegenläufig.

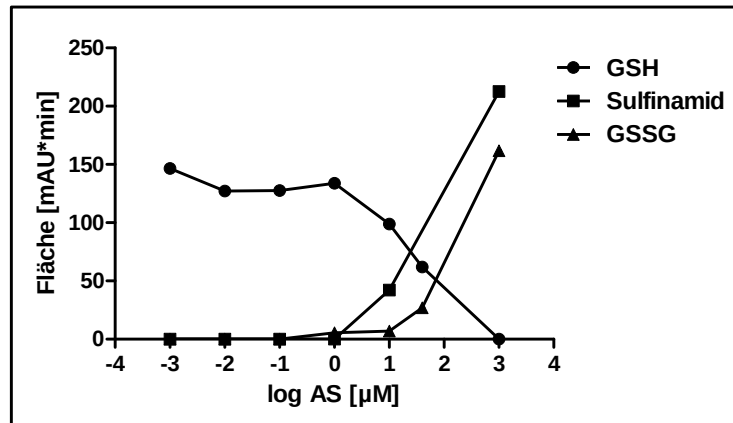


Abb. 3.8 HPLC-Analyse der Proben, bestehend aus aufsteigenden Konzentrationen von Angeli's Salz und 100 µM Glutathion, nach 1 h Inkubation bei 37°C

3.5.2 Produkte der Reaktion zwischen NCA und Glutathion

Bei NCA Konzentrationen zwischen 200 nM und 2 µM konnte keine Abnahme der GSH Konzentration festgestellt werden. Ab einer Konzentration von 2 µM NCA nahm die GSH Konzentration ab. Wie Abbildung 3.9 zeigt, verhielt sich das Reaktionsprodukt GSSG, ebenso wie bei der Reaktion von GSH mit Angeli's Salz, gegenläufig. Das zweite mögliche Reaktionsprodukt Sulfinamid konnte mit NCA jedoch unter keinen Bedingungen nachgewiesen werden.

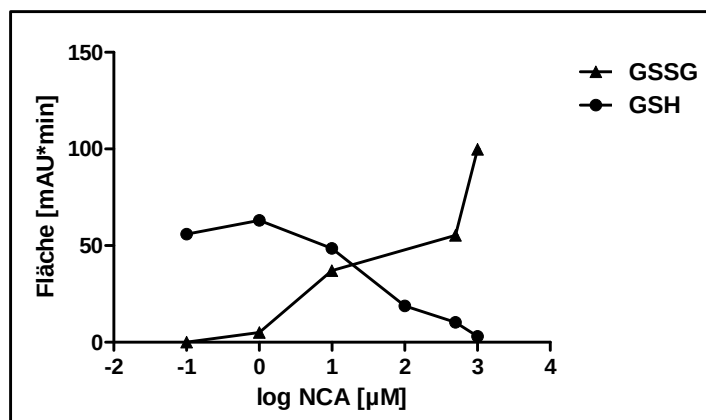


Abb. 3.9 HPLC-Analyse der Proben, bestehend aus aufsteigenden Konzentrationen von NCA und 100 µM Glutathion, nach 1 h Inkubationszeit bei 37°C

4 Diskussion

Seit die vielfältigen und vielversprechenden Wirkungen der Stickstoffspezies HNO bekannt sind, erfährt dieses Molekül gesteigertes Interesse der Forschung. Die in der Einleitung beschriebene Reaktivität von HNO erfordert den Gebrauch von Donatoren. Bisherige Studien benutzten fast ausschließlich den altbewährten Donator *Angeli's Salz*. Dieser über 100 Jahre alte Donator besitzt entscheidende Nachteile bei der Planung von Experimenten *in vivo*. *Angeli's Salz* wird in NaOH gelöst und ist somit lagerfähig. Bei biologischen Systemen mit geringer Pufferkapazität kann der hervorgerufene Effekt auch Ausdruck einer für die Zellen dramatischen Veränderung des pH-Wertes durch den stark basischen Donator sein (Fukuto JM et al., 2008). Ein weiteres Problem ergibt sich durch die sehr kurze Halbwertszeit des *Angeli's Salz* von 2,5 Minuten bei 37 °C. Die Abgabe von HNO entspricht eher einem Bolus als einer kontinuierlichen Freisetzung (Fukuto JM et al., 2008).

Ein Donator mit einer kontinuierlicheren Abgabe von HNO bei physiologischem pH von 7,4 könnte diese Unsicherheiten bei der Interpretation von Versuchsergebnissen unterbinden. Gleichzeitig würde die Reproduzierbarkeit vorhergehender Versuchsergebnisse mit Hilfe eines neuartigen Donators zusätzliche Sicherheit über die Wirkung von HNO geben. Ziel dieser Studie war es, mit Hilfe des Donators *NCA*, welcher die oben geforderten Eigenschaften erfüllt, bisherige Ergebnisse zu überprüfen und die Grundlage für Experimente *in vivo* zu schaffen. Zuerst wurde die Wirkung von *NCA* an isolierten Kardiomyozyten untersucht. Anschließend wurden die auf Zellebene gewonnenen Ergebnisse am intakten isolierten Herzen überprüft. Zusätzlich wurde die Reaktivität von *NCA* mit der von *Angeli's Salz* auf molekularer Ebene verglichen.

4.1 Wirkung von NCA auf die Sarkomerlänge

Bei der Untersuchung der Sarkomerlänge von isolierten Kardiomyozyten unter Einfluß von NCA konnte eine starke Zunahme der Kontraktilität beobachtet werden. Diese war abhängig von der hinzugegebenen Konzentration. Bei einem Wert von 45 μM NCA wurde ein Kompromiss zwischen zuverlässiger Antwort und maximaler Kontraktilität gefunden. Bei niedrigeren oder höheren Konzentrationen konnte weniger häufig eine Reaktion auf NCA beobachtet werden. Dass einige Zellen keine Antwort zeigten, lag möglicherweise an ihrem Zustand zum Zeitpunkt der Messung. Obwohl die Zellen nach den in 2.3.1 genannten Qualitätskriterien selektiert wurden, können Zellen mit nicht offensichtlichen Schädigungen in die Messgruppe gelangt sein. Ein weiterer Schwachpunkt könnte in der Applikation des NCA liegen. Da aus Kostengründen der Donator in Kleinstmengen mit Hilfe einer Pipette in die Messkammer des IonOptix Systems überführt wurde, lag direkt nach Hinzugabe eine ungleiche Verteilung des NCA vor. Eine manuelle Durchmischung wurde durch die bereits gestartete Messung verhindert. Jedoch sollte, anders als bei *Angeli's Salz*, durch die kontinuierliche und langsame Freisetzung von HNO aus NCA genügend Zeit für eine gleichmäßige Verteilung des Donators vor dem Wirkeintritt sein.

Neben dem positiv inotropen Effekt konnte häufig, anders als bei *Angeli's Salz*, ein Absinken der diastolischen Sarkomerlänge beobachtet werden. Dies entspricht einer gesteigerten Vorspannung der Myofilamente, bzw. einer verminderten Fähigkeit zur vollständigen Entspannung. Der positiv inotrope Effekt ist vermutlich auf die direkte Wirkung von HNO auf den RyR2 und die SERCA zurückzuführen (Paolocci N et al., 2007; Tocchetti CG et al., 2007). Die erhöhte Kalziumionenzirkulation innerhalb der Zelle führt zu einer verstärkten Kontraktion. Durch ein erhöhtes basales Kalziumionenangebot innerhalb der Zelle würde sich das Absinken der diastolischen Sarkomerlänge erklären (s.u.). Jedoch bleibt nach Abklingen der positiven Inotropie und der Rückkehr der systolischen Sarkomerlänge auf ihr ursprüngliches Niveau die diastolische Vorspannung erhalten. Eine mögliche Erklärung wäre eine bleibende strukturelle Veränderung der Rezeptormoleküle durch HNO. Dies scheint jedoch wenig wahrscheinlich, da *Angeli's Salz* keine ähnliche Reaktion hervorruft.

Während sich die Kontraktilität massiv verbessert, wird die Dauer einer einzelnen Kontraktion nicht tangiert. Obwohl sich die Zeitspanne bis zur maximalen Kontraktion um 42 % verlängert, ist die Geschwindigkeit der Kontraktion um 80 % erhöht. Ein Teil der längeren Dauer bis zur maximalen Verkürzung wird also durch eine stark erhöhte Kontraktionsgeschwindigkeit kompensiert. Die Zeitspanne zwischen maximaler Verkürzung und halbmaximaler Entspannung wird um 69 % verringert und kompensiert damit die zuvor benötigte Zeit zum Erreichen einer stärkeren Kontraktion. Da die Auslösung einer Kontraktion an die intrazelluläre Kalziumionenkonzentration gebunden ist, muss das durch *NCA* freigesetzte HNO stimulierend auf die Freisetzung und den Rücktransport von Kalziumionen wirken.

4.2 Wirkungen von *NCA* auf die intrazelluläre Kalziumionenzirkulation

Bisherige Studien konnten belegen, dass die erhöhte Kontraktilität bei Anwesenheit von HNO durch eine verstärkte Kalziumionenzirkulation innerhalb der Zelle verursacht wird (Paolucci N et al., 2007; Tocchetti CG et al., 2007). Offenbar beeinflusst HNO direkt, ohne Aktivierung des β -adrenergen Systems, den RyR2 und die SERCA (Paolucci N et al., 2003; Tocchetti CG et al., 2007). Diese Umgehung der cAMP-modulierten Aktivierung der Kalziumionenzirkulation ist wahrscheinlich nicht von den typischen Begleiterscheinungen chronisch erhöhter β -Agonisten betroffen (Bristow MR, 2000; El-Armouche A, Eschenhagen T, 2008).

Unter Einfluß von 45 μ M *NCA* wurde eine um 58 % erhöhte intrazelluläre Kalziumionenkonzentration gemessen. Die positive Inotropie scheint direkt mit einer erhöhten Ausfuhr von Kalziumionen aus dem SR zusammenzuhängen. Die Zeitspanne eines Kalziumionenmaximums wurde nicht verändert, was für eine ebenso erhöhte Elimination der Kalziumionen aus dem Zytoplasma spricht. Eine Wirkung auf den RyR2 und die SERCA ist als wahrscheinlich anzusehen. Zusätzlich wurde die Kurve der Kalziumströme nach Hinzugabe von *NCA* in ihrer Gesamtheit nach oben verschoben. Die basale oder „diastolische“ Konzentration der intrazellulär vorliegenden Kalziumionen war erhöht. Möglicher-

weise erklärt dies die oben beschriebene basale Vorspannung der Herzmuskelzelle.

4.3 Überprüfung der pharmakologisch wirksamen Substanz

Arbeiten anderer Arbeitsgruppen mit *NCA* ließen im Verlauf der Studie den Verdacht aufkommen, dass die beobachteten Effekte nicht ausschließlich durch HNO ausgelöst wurden. Die Möglichkeit einer zusätzlichen Wirkung des Donatormoleküls konnte nicht ausgeschlossen werden. Hierbei wird deutlich, dass die Arbeit mit Donatoren zu einer erschwerten Interpretation der Versuchsergebnisse führt (Fukuto JM et al., 2008). Neben HNO werden bei allen Donatoren Nebenprodukte freigesetzt, welche teilweise ebenso einen biologischen Effekt erzielen können. Die Überprüfung von bereits publizierten Ergebnissen mit einem neuartigen Donator, wie z.B. *NCA*, geben somit zusätzliche Sicherheit über die Richtigkeit der Daten.

Mit Hilfe eines leicht veränderten *NCA**, welches eine derart starke Verbindung zu seinem HNO-Molekül aufweist, dass dieses nicht abgegeben wird, wurden die Versuchsergebnisse überprüft. Unter Einfluß von 45 μM *NCA** konnte keine signifikante Änderung der Kontraktilität festgestellt werden.

4.4 Wirkung von *NCA* auf die Kontraktionskraft von intakten Langendorff-perfundierten Mausherzen

Auf Ebene der isolierten Herzmuskelzelle konnte eine positive Inotropie, verursacht durch *NCA*, nachgewiesen werden. Da die Zellen bei diesem Versuchsaufbau nicht gebunden in Lösung vorliegen, ist berechtigte Kritik an der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf eine, sich im Zellverbund befindliche Herzmuskelzelle, zu äußern. Zur Überprüfung der im IonOptix System gewonnenen Daten, wurde die Methode des Langendorff-perfundierten Mausherzes gewählt. Das Herz bleibt nach der Entnahme aus dem Tier intakt und kontrahiert durch seine Eigenerrregung im Sinusknoten ohne externe Stimulation. Durch Hinzugabe von 45 μM *NCA* ergab sich eine leichte Zunahme der Kontraktionskraft. Diese Übertragung der Versuchsergebnisse von der Zellebene auf die des intakten

Herzmuskelgewebes konnte zum ersten Mal gezeigt werden. Die Standardfehler deuten jedoch auf eine bisher geringe Aussagekraft hin. Weitere Experimente mit dieser Methode sollten zu größerer Sicherheit bei der Prüfung der oben genannten Übertragbarkeit führen.

4.5 Möglichkeiten des therapeutischen Einsatzes bei Herzinsuffizienz

Zusätzlich zur Standardtherapie mit ACE-Hemmern wird heute bei chronischer Herzinsuffizienz der NYHA-Stadien II - IV der Einsatz von β -Blockern empfohlen (Paolucci N et al., 2007), um den Folgen des dauerhaft aktivierten β -adrenergen Systems entgegenzuwirken. Trotz der daraus folgenden Bradykardie und Blutdruckminderung erhöht sich die Überlebensrate der Patienten unter β -Blocker-Therapie. Alle positiv inotropen Substanzen (außer Herzglykoside) führen laut aktueller Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie zu einer erhöhten Sterblichkeitsrate und sind somit in der Standardtherapie nicht einzusetzen (Leitlinien Herzinsuffizienz der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie- Herz- und Kreislaufforschung e.V.). Die erhöhte Anfälligkeit für Arrhythmien bei Therapie mit den bisher genutzten positiv inotropen Substanzen erklärt diese Tatsache. Bisher ist nicht bekannt, dass HNO ähnlich negative Auswirkungen hat.

Um eine wesentliche Verbesserung der Kontraktilität des Herzmuskels zu erreichen, könnte HNO als positiv inotrope Substanz die bisherige Therapie ergänzen. Dies ist nur möglich, da eine direkte Aktivierung der Kalziumzirkulation unter Umgehung eines cAMP-Anstieges wahrscheinlich ist. Eine Beeinflussung der β -Blocker-Therapie ist ebenso nicht zu erwarten. Hinzu kommt der vasodilatatorische Effekt von HNO, welcher zusammen mit den oben beschriebenen Wirkungen eine Möglichkeit der sinnvollen Ergänzung heutiger Therapiestandards bieten könnte. Bei der chronischen Herzinsuffizienz kommt es durch die erhöhte Aktivität des Sympathikus und des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems zu einer Vasokonstriktion. HNO könnte somit trotz seiner positiv inotropen Wirkung einer systemischen arteriellen Hypertonie entgegenwirken. Um einer ausge-

prägen Hypotension vorzubeugen, sollte der kombinierte Einsatz von HNO und ACE-Hemmern im Vorfeld gründlich überprüft werden.

4.6 Vergleich der Pharmakokinetik der HNO Donatoren *Angeli's Salz* und NCA mittels HPLC

Während der Erprobung von NCA an isolierten Kardiomyozyten fiel auf, dass die für einen ähnlichen Effekt in der Literatur angegebene Konzentration von *Angeli's Salz* um ein Vielfaches höher lag (Tocchetti CG et al., 2007). Eine mögliche Erklärung für diese Tatsache wären die unterschiedlichen Freisetzungsraten der beiden Donatoren (s.o.). Donzelli et. al. beschrieben 2006 das Sulfinamid als Indikator für das Vorhandensein von HNO in biologischen Systemen (Donzelli S et al., 2006). Mittels HPLC konnte in dieser Studie ein vergleichbares Ergebnis mit dem Donator *Angeli's Salz* reproduziert werden. Eine Übertragung auf NCA war unter keinen Umständen möglich. Es konnte kein Sulfinamid nachgewiesen werden.

Eine Erklärung könnte die wesentlich langsamere Freisetzung von HNO durch NCA sein. Wie oben beschrieben reagiert HNO mit Glutathion (GSH) unter Bildung eines Zwischenproduktes entweder zu Disulfid (GSSG) oder Sulfinamid. Zur Bildung von GSSG ist wiederum GSH notwendig. Bei *Angeli's Salz* findet innerhalb kürzester Zeit eine massive Freisetzung von HNO statt. Möglicherweise sind zu diesem Zeitpunkt nicht überall genügend freie GSH-Moleküle vorhanden und eine Umstrukturierung zu Sulfinamid kann erfolgen. Die langsame Freisetzung durch NCA lässt eine ständige Überzahl von GSH zu und favorisiert somit die Bildung von GSSG.

Da die Produktion von Sulfinamid irreversibel ist, könnte ein großer Teil des durch *Angeli's Salz* produzierten HNO bereits in einer inaktiven Form vorliegen, bevor es seine Wirkung an der Herzmuskelzelle entfalten darf. Um den Grund des Bedarfs der wesentlich höheren Konzentration von *Angeli's Salz* in Gänze zu verstehen, bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen.

5 Zusammenfassung

Die Stickstoffspezies HNO (Nitroxyl) erfährt seit einiger Zeit erhöhte Aufmerksamkeit der Forschung, begründet durch die vielfältigen und vielversprechenden Wirkungen insbesondere auf das kardiovaskuläre System. Der Effekt einer systemischen Vasodilatation und gleichzeitig positiven Inotropie des Herzens lässt eine potentielle Alternative zur bisherigen Therapie der Herzinsuffizienz erhoffen. Bestärkend ist der cAMP- und β -adrenerg-unabhängige Wirkungsweg, der vermutlich durch einen direkten Angriff an Thiolstrukturen von Schlüsselproteinen wie SERCA und RyR₂ seine Effekte zeigt.

Die hohe Reaktivität von HNO erfordert den Gebrauch von Donatoren. Der Standard ist der über 100 Jahre alte Donator *Angeli's Salz*. Die Lagerung in NaOH unter stark basischen Bedingungen, sowie die kurze Halbwertszeit wirken limitierend auf den Einsatz in biologischen Systemen. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit der neuartige Donator NCA verwendet. Dieser Donator zeigt bei physiologischem pH-Wert eine kontinuierliche Abgabe von HNO und ist in der Lage Unsicherheiten bei der Interpretation von Versuchsergebnissen zu verringern.

Ziel dieser Studie war es, mit Hilfe des Donators NCA, bisherige Ergebnisse zu überprüfen und die Grundlage für Experimente *in vivo* zu schaffen. Zuerst wurde die Wirkung von NCA an isolierten Kardiomyozyten untersucht. Anschließend wurden die auf Zellebene gewonnenen Ergebnisse am intakten isolierten Herzen überprüft.

Es konnte sowohl an den isolierten Kardiomyozyten als auch am intakten Herzmuskelgewebe eine positiv inotrope Reaktion festgestellt werden. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass die Leistungssteigerung durch eine erhöhte intrazelluläre Kalziumionenzirkulation begleitet wird und die These der direkten Wirkung von HNO auf die an dem Kontraktionsmechanismus beteiligten Proteinstrukturen unterstützt.

6 Abkürzungsverzeichnis

Vorsätze für SI-Einheiten

k Kilo (10^3)

m Milli (10^{-3})

μ Mikro (10^{-6})

n Nano (10^{-9})

%

Prozent

°C

Grad Celsius

NCA

Donator der Gruppe der Acyloxy Nitroso Compounds

Angeli's Salz

$\text{Na}_2\text{N}_2\text{O}_3$ (Donator)

ATP

Adenosintriphosphat

BDM

2,3-butandion monoxim

cAMP

zyklisches Adenosinmonophosphat

cGMP

zyklisches Guanosinmonophosphat

CGRP

calcitonin gene-related receptor

CICR

kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung

DHPR

Dihydropyridinrezeptor

DMSO

Dimethylsulfoxid

EDC

Excitation Dichronic Cube

EDTA

Ethylendiamintetraacetat

F340/380

Floureszenzintensitätenverhältnis bei 340 und 380 nm Wellenlänge

g

Gramm

g

Erdbeschleunigung (9,8 m/s²)

GSH

Glutathion

GSSG

Dimer von GSH (Glutathion)

h

Stunde

HEPES

4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure

HNO

Nitroxyl

HPLC

Hochleistungsflüssigkeitschromatografie

Hz

Hertz (1/s)

IU

Internationale Einheiten

m

Meter

M

Molar

MS

Massenspektrometrie

N

Newton

NCX

Natrium-Kalzium-Austauscher

NHE

Normalwasserstoffelektrode

pKa

Säurekonstante

PKA

Proteinkinase A

PMT

Photo Multiplier Tube

RyR2

Ryanodinrezeptor Typ 2

s

Sekunde

SERCA

Sarkoendoplasmatisches-Retikulum-Kalzium-ATPase

SR

Sarcoplasmatisches Retikulum

UV

ultraviolett

V

Volt

W

Watt

7 Literaturverzeichnis

Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 2002;415:198-205.

Bristow MR. beta-adrenergic receptor blockade in chronic heart failure. *Circulation*. 2000;101:558-69.

Cazorla O, Szilagyi S, Vignier N, Salazar G, Krämer E, Vassort G, Carrier L, Lacampagne A. Length and protein kinase A modulations of myocytes in cardiac myosin binding protein C-deficient mice. *Cardiovasc Res*. 2006;69:370-80.

DeMaster EG, Redfern B, Nagasawa HT. Mechanisms of inhibition of aldehyde dehydrogenase by nitroxyl, the active metabolite of the alcohol deterrent agent cyanamide. *Biochem Pharmacol*. 1998;55:2007-15.

Donzelli S, Espey MG, Thomas DD, Mancardi D, Tocchetti CG, Ridnour LA, Paolocci N, King SB, Miranda KM, Lazzarino G, Fukuto JM, Wink DA. Discriminating formation of HNO from other reactive nitrogen oxide species. *Free Radic Biol Med*. 2006;40:1056-66.

Donzelli S, Espey MG, Flores-Santana W, Switzer CH, Yeh GC, Huang J, Stuehr DJ, King SB, Miranda KM, Wink DA. Generation of nitroxyl by heme protein-mediated peroxidation of hydroxylamine but not N-hydroxy-L-arginine. *Free Radic Biol Med*. 2008;45:578-84.

El-Armouche A, Eschenhagen T. beta-Adrenergic stimulation and myocardial function in the failing heart. *Heart Fail Rev*. 2008.

Fukuto JM, Bartberger MD, Dutton AS, Paolocci N, Wink DA, Houk KN. The physiological chemistry and biological activity of nitroxyl (HNO): the neglected, misunderstood, and enigmatic nitrogen oxide. *Chem Res Toxicol*. 2005;18:790-801. (a)

Fukuto JM, Dutton AS, Houk KN. The chemistry and biology of nitroxyl (HNO): a chemically unique species with novel and important biological activity. *Chem-BioChem*. 2005;6:612-9. (b)

Fukuto JM, Jackson MI, Kaludercic N, Paolocci N. Examining nitroxyl in biological systems. *Methods Enzymol.* 2008 ;440:411-431.

Granzier HL, Labeit S. The giant protein titin: a major player in myocardial mechanics, signaling, and disease. *Circ Res.* 2004;94:284-95.

Irvine JC, Ritchie RH, Favaloro JL, Andrews KL, Widdop RE, Kemp-Harper BK. Nitroxyl (HNO): the Cinderella of the nitric oxide story. *Trends Pharmacol Sci.* 2008;29:601-608.

Kentish JC, McCloskey DT, Layland J, Palmer S, Leiden JM, Martin AF, Solaro RJ. Phosphorylation of troponin I by protein kinase A accelerates relaxation and crossbridge cycle kinetics in mouse ventricular muscle. *Circ Res.* 2001;88:1059-1065.

LeitlinienHerzinsuffizienz DGK [Online im Internet].

URL: <http://www.dgk.org/Leitlinien/LeitlinienHerzinsuffizienz.pdf> [16.03.2009]

O'Connell TD, Ni YG, Lin K-M, Han H, Yan Z. Isolation and Culture of Adult Mouse Cardiac Myocytes for Signaling Studies. *AfCS Research Reports* 1. 2003;No. 5 CM [Online im Internet].

URL: <http://www.afcs.org/reports/v1/CM0005/CM0005.htm> [19.12.2008]

Ottenheijm C, Heunks L, Dekhuijzen R. Diaphragm adaptations in patients with COPD. *Respir Res.* 2008;9:12.

Paolocci N, Saavedra WF, Miranda KM, Martignani C, Isoda T, Hare JM, Espey MG, Fukuto JM, Feelisch M, Wink DA, Kass DA. Nitroxyl anion exerts redox-sensitive positive cardiac inotropy in vivo by calcitonin gene-related peptide signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:10463-8.

Paolocci N, Katori T, Champion HC, St John ME, Miranda KM, Fukuto JM, Wink DA, Kass DA. Positive inotropic and lusitropic effects of HNO/NO⁻ in failing hearts: independence from beta-adrenergic signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:5537-42.

Paolocci N, Jackson MI, Lopez BE, Miranda K, Tocchetti CG, Wink DA, Hobbs AJ, Fukuto JM. The pharmacology of nitroxyl (HNO) and its therapeutic potential: not just the Janus face of NO. *Pharmacol Ther.* 2007;113:442-58.

Sha X, Isbell TS, Patel RP, Day CS, King SB. Hydrolysis of acyloxy nitroso compounds yields nitroxyl (HNO). *J Am Chem Soc.* 2006;128:9687-92.

Tocchetti CG, Wang W, Froehlich JP, Huke S, Aon MA, Wilson GM, Di Benedetto G, O'Rourke B, Gao WD, Wink DA, Toscano JP, Zaccolo M, Bers DM, Valdivia HH, Cheng H, Kass DA, Paolocci N. Nitroxyl improves cellular heart function by directly enhancing cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} cycling. *Circ Res.* 2007;100:96-104.

Wink DA, Miranda KM, Katori T, Mancardi D, Thomas DD, Ridnour L, Espey MG, Feelisch M, Colton CA, Fukuto JM, Pagliaro P, Kass DA, Paolocci N. Orthogonal properties of the redox siblings nitroxyl and nitric oxide in the cardiovascular system: a novel redox paradigm. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285:H2264-76.

Wong PS, Hyun J, Fukuto JM, Shirota FN, DeMaster EG, Shoeman DW, Nagasawa HT. Reaction between S-nitrosothiols and thiols: generation of nitroxyl (HNO) and subsequent chemistry. *Biochemistry.* 1998;37:5362-71.

Yoo J, Fukuto JM. Oxidation of N-hydroxyguanidine by nitric oxide and the possible generation of vasoactive species. *Biochem Pharmacol.* 1995;50:1995-2000.

9 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift:

10 Danksagung

Herrn Prof. Dr. T. Eschenhagen danke ich für die Möglichkeit, im Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie diese Arbeit durchzuführen.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. Böger, für die Aufnahme in seinen Arbeitsbereich und die stets hilfreiche und umfassende Art der Betreuung.

Frau Dr. S. Donzelli danke ich für die Hilfe bei der Planung und der kritischen Bewertung meiner Versuche. Ebenso danke ich ihr für die stets motivierenden und hilfreichen Gespräche, welche entscheidend zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Dr. L. Pohlmann danke ich für die großartige Unterstützung bei der Einarbeitung.

Weiterhin möchte ich allen nichtgenannten Mitgliedern des Instituts, insbesondere den Mitgliedern des Arbeitsbereichs Klinische Pharmakologie, für den freundlichen und hilfsbereiten Umgang danken.

Abschließend danke ich meiner Familie für ihre uneingeschränkte Unterstützung.