

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie

Prof. Dr. med. Rainer H. Böger

## **Wirkungsweise des Nitroxyldonators NCA an hypertrophierten und $\beta$ -adrenerg desensibilisierten Kardiomyozyten**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Azadeh Wahab

Hamburg 2012

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 08.05.2013

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

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

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: PD Dr. K. Sydow

Prüfungsausschuss, dritte Gutachterin: Prof. Dr. L. Carrier

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>6</b>
1.1	Physiologie der Herzaktion	7
1.2	Physiologische Modulation der Herzaktion	9
1.2.1	Kalzium-Sensitivität der Myofilamente	9
1.2.2	Neurohumorale Aktivierung	10
1.2.2.1	Sympathische Aktivierung	10
1.2.2.2	Humorale Aktivierung	11
1.3	Pathophysiologie der Herzinsuffizienz	12
1.4	Therapieansätze	14
1.5	Chemie von HNO	16
1.6	HNO-Donatoren	18
1.7	HNO-Effekte auf das kardiovaskuläre System	20
1.8	Fragestellung	23
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>24</b>
2.1	Mauslinie	24
2.2	Implantation osmotischer Minipumpen	24
2.3	Echokardiographie	25
2.4	Isolation von intakten Kardiomyozyten der Maus	26
2.5	IonOptix System-Datenerfassung und Analyse	28
2.5.1	Versuchsaufbau	29
2.5.2	Sarkomerlängenmessung	30
2.5.3	Zusammenstellung der Kurvenparameter der Sarkomerlängenmessung	31
2.5.4	Intrazelluläre Kalziumstrommessung mit Fura-2	33
2.5.5	Zusammenstellung der Kurvenparameter der Kalziumstrommessung	38

2.6	1-Nitrosocyclohexyl Acetat HNO-Donator	40
2.7	Statistische Auswertungen	41
2.8	Liste der Chemikalien	41
2.9	Liste der Verbrauchsmaterialien	42
2.10	Liste der Laborgeräte	43
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>45</b>
3.1	Hypertrophie induziert durch chronische $\beta$ -adrenerge Stimulation	45
3.1.1	Echokardiographische Untersuchungen vor und nach chronischer $\beta$ -adrenerger Stimulation	45
3.1.2	Sarkomerlängenmessung in vitro nach chronischer $\beta$ -adrenerger Stimulation	46
3.2	Wirkung von Isoprenalin auf die Sarkomerlänge von Kardiomyozyten nach chronischer $\beta$ -adrenerger Stimulation	47
3.3	Wirkung von NCA auf die Sarkomerlänge von Kardiomyozyten nach chronischer $\beta$ -adrenerger Stimulation	49
3.3.1	Kontrollexperimente	49
3.3.2	Herstellung einer Konzentrations-Wirkungs-Beziehung	50
3.3.3	Messkurven unter Einfluss von NCA	53
3.3.4	Wirkung von NCA auf die intrazelluläre Kalziumionenzirkulation nach chronischer $\beta$ -adrenerger Stimulation	55
3.4.1	Simultane Sarkomerlängen- und Kalziumstrommessung	55
3.4.2	Veränderung der Kurvenparameter unter Einfluss von 60 $\mu$ M NCA	55
3.4.3	Zusammenfassung	61
3.5	Wirkung von NCA auf das Sarkoplasmatische Retikulum	62
3.6	Überprüfung der pharmakologisch wirksamen Substanz	63
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>65</b>
4.1	Hypertrophie induziert durch chronische $\beta$ -adrenerge Stimulation	66

4.2	Pharmakologische Untersuchungen der myokardialen Kontraktilität	67
4.2.1	Wirkung von Isoprenalin auf die Kontraktilität von Kardiomyozyten nach chronischer $\beta$ -adrenerger Stimulation	67
4.2.2	Wirkung von NCA auf die Kontraktilität von Kardiomyozyten nach chronischer $\beta$ -adrenerger Stimulation	69
4.3	Wirkung von NCA auf die Kalzium-Homöostase	71
4.4	Wirkung von NCA auf das Sarkoplasmatische Retikulum	76
4.5	Klinische Relevanz und Ausblick	78
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>81</b>
<b>6.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>83</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>86</b>
<b>8.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>93</b>
<b>9.</b>	<b>Veröffentlichungen</b>	<b>94</b>
<b>10.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>95</b>
<b>11.</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>96</b>

## **1. Einleitung**

Die Herzinsuffizienz repräsentiert eine häufige internistische Erkrankung, von der geschätzt mehr als 10 Mio. Menschen in Europa betroffen sind. Eine vergleichbar große Anzahl an Patienten hat eine systolische kardiale Dysfunktion ohne Herzinsuffizienzsymptome (ESC-European Heart Clinical Practice Guidelines 2008). In der Todesursachenstatistik des statistischen Bundesamtes der Bundesrepublik Deutschlands von 2010 liegt die Herzinsuffizienz auf Platz drei noch vor den Krebserkrankungen. Auch weltweit stellt sie eine der häufigsten Ursachen für Morbidität und Mortalität dar.

Bisher hat es sich jedoch als schwierig erwiesen, eine effektive und vor allem risikoarme Therapie zur Behandlung der abnehmenden Kontraktionsfähigkeit des Herzens zu entwickeln. Viele Medikamente, die bisher zur Anwendung kamen, gingen mit einer erhöhten Mortalität einher (Hasenfuss und Teerlink 2011). Eine Ursache könnte der darunter ansteigende cAMP/PKA-Spiegel sein. Einen neuen therapeutischen Ansatz, um die Kontraktilität zu steigern und gleichzeitig die  $\beta$ -adrenerge Desensibilisierung sowie die cAMP-Signalkaskade zu umgehen, könnte die inotrop wirkende Substanz Nitroxyl (HNO) darstellen.

HNO gehört wie das gasförmige Signalmolekül Stickstoffmonoxid (NO) zu den Spezies der Stickstoffoxide. Seit Jahrzehnten findet NO als Vasodilator in der Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen wie Angina pectoris und Herzinsuffizienz Verwendung. Toleranzentwicklung und ein niedriges Ansprechen unter oxidativem Stress schränken den Einsatz von NO allerdings ein. Interessanterweise sind die Effekte und Signalwege von HNO unterschiedlich und unabhängig von der verwandten Spezies NO, wodurch HNO eine erhöhte Aufmerksamkeit unter den Stickstoffoxiden erlangt hat. Seit einigen Jahren bemühen sich verschiedene Arbeitsgruppen die potentiell wichtigen biologischen und pharmakologischen Eigenschaften von HNO zu beschreiben. Besonders die günstigen Wirkungen auf das kardiovaskuläre System und dem damit verbundenen therapeutischen Potential in der Therapie der Herzinsuffizienz steigern das Interesse und den Wunsch, die Wege und Angriffspunkte von HNO

genauer zu erforschen als auch neue therapeutische Strategien zu finden, mit dem Ziel die Funktion des Herzen zu verbessern.

## 1.1 Physiologie der Herzaktion

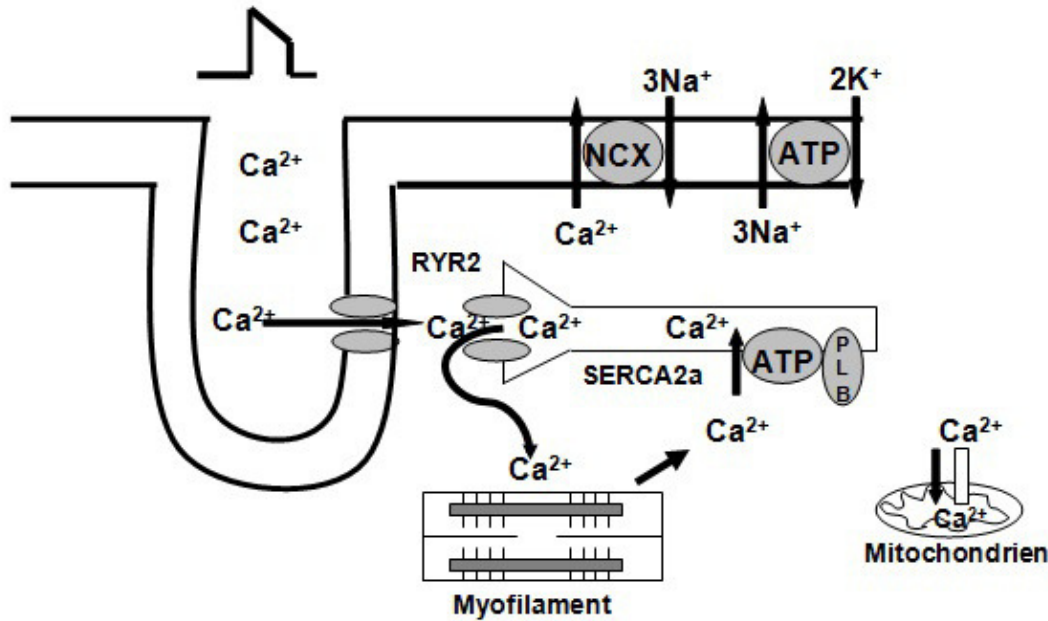
Kalzium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) spielt eine wesentliche Rolle in der elektromechanischen Kopp- lung. Damit eine Kontraktion auslösbar ist, muss die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Kon- zentration reguliert ansteigen. Während des Muskelaktionspotenzials gelangt das  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Extrazellularraum über spannungsgesteuerte Dihydropyridin- empfindliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (DHPR= L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle) in das Zellinnere. Da- durch steigt lokal die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Dieser Funke triggert nun die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem - als  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher fungierenden- Sar- koplasmatischen Retikulum (SR). Es öffnen sich die Ryanodinrezeptoren des SR und das ausströmende  $\text{Ca}^{2+}$  führt schließlich die elektromechanische Kopp- lung der Herzkontraktion herbei. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Zytosol steigt dabei von circa  $10^{-7}$  diastolisch auf  $10^{-5}$  mol/l systolisch. Über Diffusion gelangt das  $\text{Ca}^{2+}$  zu den Myofilamenten. Diese bestehen aus dünnen und dicken Fasern, wobei die dicken Filamente aus Myosin und die dünnen aus Aktin, Tropomyosin und dem Heterotrimer Troponin (TnT, TnI, TnC) bestehen. Das Troponin und das Tropomyosin regulieren die Interaktion von Aktin mit Myosin. Während der Diastole ist die Bindungsstelle des Aktins durch Troponin I und Tropomyosin blockiert. In der Systole bindet das frei gewordenen  $\text{Ca}^{2+}$  an das TnC. Wenn alle  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen besetzt sind, erfolgt eine Positionsänderung des Tropomyosins, TnI und TnT, sodass die Bindungsstellen an den Aktinfilamenten frei werden und somit die Myosinköpfechen daran binden können. Das Myosin- köpfchen setzt sich am Aktinfilament (Querbrückenbindung) fest und spaltet ATP in ADP. Die daraus entstandene Energie wird genutzt, um das Filament zu bewegen. Es kommt zur Verkürzung der Herzmuskelzellen und im Verband zu einer Kontraktion des Muskels (Bers et al. 2002 und 2008).

Zur Relaxation der Herzmuskelzellen kommt es wiederum durch die Abnahme der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Dies erfolgt durch einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Rückstrom in das SR mithilfe der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA2a) sowie in den Extrazel- lularraum reguliert durch die sarkolemmale  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase und den  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

Austauschcarrier (NCX). Ein geringer Anteil fließt über den  $\text{Ca}^{2+}$ -Uniporter in die Mitochondrien. Der NCX befördert drei  $\text{Na}^{+}$ -Ionen nach intrazellulär im Austausch mit einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion nach extrazellulär. Dieser Austausch ist jedoch abhängig vom Ionengradienten auf beiden Seiten der Membran und vom Membranpotenzial. Während eines Aktionspotenzials, also im erregten Myozyten, wird  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle befördert. Im nicht erregten und ruhenden Myozyten (diastolisch) fördert der NCX die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus der Zelle heraus. Insgesamt überwiegt beim NCX der Netto-Auswärtstransport (Bers et al. 2008).

Die SERCA2a ist das Hauptprotein zur Erniedrigung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes. Die Aktivität der SERCA2a wird durch das inhibitorische Regulatorprotein Phospholamban (PLB) reguliert. Dabei wirkt die Bindung des nicht-phosphorylierten PLB hemmend. Eine Phosphorylierung des PLB beispielsweise durch das cyclische AMP löst diese Inhibition auf und veranlasst eine Relaxationssteigerung durch einen schnellen Rücktransport der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in das SR. Eine Erhöhung des cAMP-Spiegels erfolgt über eine Stimulierung der  $\beta$ -Rezeptoren. Dies bedeutet, dass eine sympathische Aktivierung des Myokards, neben der Frequenz- und Inotropiesteigerung zu einer rascheren diastolischen Relaxation führt.





**Abb. 1.1:** Schematische Darstellung der Vorgänge der elektromechanischen Kopplung: Der Kalziueinstrom in die Zelle während des Aktionspotentials und der Kalziumrückstrom nach Extrazellulär und in die Mitochondrien während der Relaxation sind durch Pfeile gekennzeichnet. RyR2: Ryanodinrezeptor 2, PLB: Phospholamban, SERCA2a: Ca<sup>2+</sup>-ATPase des Sarkoplasmatischen Retikulums, ATP: ATPase, NCX: Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> Austauscher.

## 1.2 Physiologische Modulation der Herzaktion

Es gibt zwei Wege die Kontraktionskraft des Myokards zu verändern. Zum einen durch die Änderung der Amplitude oder der Dauer des Ca<sup>2+</sup>-Transienten sowie durch Modulation der Ca<sup>2+</sup>-Sensitivität des kontraktiven Apparates. Die verschiedenen Mechanismen werden im Folgenden beschrieben.

### 1.2.1 Kalzium- Sensitivität der Myofilamente

Die Sensitivität für Ca<sup>2+</sup> kann bis zu einem gewissen Maße dynamisch über eine Dehnung der Myofilamente gesteigert werden, was zu einer stärkeren Kontraktion führt. *In vivo* erfolgt diese Dehnung über die Füllung des Herzens mit Blut. Eine vermehrte Füllung während der Diastole führt damit zu einer Volumenbelastung des Herzens und kompensatorisch zu einer Steigerung der

Kontraktions- und Auswurfleistung. Dieser Vorgang wird als Frank-Starling-Mechanismus bezeichnet. Doch auch weitere Faktoren können die Sensitivität der kontraktilen Proteine für Kalzium beeinflussen. Eine Erniedrigung dieser findet zum Beispiel durch Parameter, die bei einer Ischämie auftreten, wie einer Azidose oder erhöhten Phosphat- und Magnesiumkonzentrationen, statt. Ebenso vermindert eine  $\beta$ -adrenerge Stimulation die Kalzium-Sensitivität der Myofilamente. Eine Erhöhung erfolgt durch Koffein, HNO und einige positiv inotrope Substanzen.

## **1.2.2 Neurohumorale Aktivierung**

Die Aktivierung der neurohumoralen Systeme ermöglicht eine Anpassung und Stabilisierung des Organismus an verschiedene Belastungen. Analog zu der Situation des akuten Blutverlustes mit daraus resultierendem Blutdruckabfall kommt es auch bei der Herzinsuffizienz zu einer Aktivierung des Sympathikus und des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). Dies führt unter anderem über eine Vasokonstriktion zu einer Zentralisation des zirkulierenden Blutvolumens und stellt damit die Perfusion lebenswichtiger Organe sicher.

### **1.2.2.1 Sympathische Aktivierung**

Eines der wichtigsten Wege die Herzleistung dem Bedarf anzupassen, erfolgt über die sympathische Aktivierung. Die  $\beta$ -adrenerge Signalkaskade wirkt dabei unter anderem direkt auf das Arbeitsmyokard ein. Neben einer Erhöhung der Herzfrequenz (positiv chronotrop) und der Erregungsüberleitung (positiv dromotrop) kommt es zu einer Kontraktionssteigerung (positiv inotrop) und einer Relaxationssteigerung (positiv lusitrop).

Die Wirkung des Sympathikus entfaltet sich über die Transmitter Adrenalin und Noradrenalin, die zu einer Aktivierung von  $\beta$ 1- und  $\beta$ 2-Rezeptoren in der Membran der Herzmuskelzellen führen. Diese funktionieren über G-Proteine, welche aus drei Untereinheiten ( $G\alpha$ ,  $G\beta$ ,  $G\gamma$ ) bestehen. Die Stimulation der  $\beta$ -Adrenozeptoren führt unter Hydrolyse von GTP zu einer Abspaltung der  $G\alpha$  Untereinheit von der  $G\beta,\gamma$  Untereinheit. Über die stimulierende  $G\alpha$  Einheit ( $G_{\alpha s}$ ) kommt

es zu einer Aktivierung der Adenylatzyklase und damit zur vermehrten Bildung von cAMP. Letzteres aktiviert die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA). Die PKA wiederum phosphoryliert verschiedene Proteine, die an der Elektromechanischen Kopplung beteiligt sind und hat somit einen großen Einfluss auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase (Bers 2002, Lohse et al. 2003, Bers 2008, El-Armouche und Eschenhagen 2008). Die Offenwahrscheinlichkeit der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (DHPR) und der RYR wird durch diese Phosphorylierung erhöht und somit kommt es zu einer Erhöhung des intrazellulären Kalziumangebots. Dies geht mit einem Anstieg des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten einher.

Eine Phosphorylierung der kardialen Myofilamente, genauer des TnI, vermindert die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität der Filamente und trägt zur beschleunigten Relaxation bei. Ein weiteres Zielmolekül der PKA ist das PLB. Seine Phosphorylierung hat eine Enthemmung der SERCA zur Folge, wodurch die Kalziumkonzentration im SR ansteigt und die Myokard-Relaxation herbeigeführt wird (Bers et al. 2002). Beim nächsten Herzzyklus wird entsprechend mehr Kalzium freigesetzt. Diese Veränderungen führen zu einer positiven Inotropie und Lusitropie am Herzen. Eine Dämpfung der  $\beta$ -adrenergen Aktivität erfolgt mit Hilfe von Phosphodiesterasen (PDE), welche für den Abbau des cAMP verantwortlich sind.

### **1.2.2.2 Humorale Aktivierung**

Eine Komponente der neurohumoralen Aktivierung ist das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System. Dabei wirkt das Angiotensin II als Effektorpeptid. Neben dem direkten Einfluss auf den Salz- und Wasserhaushalt regelt es vor allem den peripheren Widerstand. Es sind auch positiv inotrope Effekte am menschlichen Vorhofgewebe nachgewiesen worden (Holubarsch et al. 1993).

Ferner gibt es noch andere pharmakologisch bedeutsame Peptide, wie z.B. das Vasopressin, Endothelin, Bradykinin oder Prostaglandine, deren Wirkungen sich überwiegend im Gefäßsystem abspielen und somit indirekt Einfluss auf die Herz- und Blutdruckfunktion haben.

Insgesamt können viele andere Faktoren *in vivo* die Kontraktilität beeinflussen. Am bedeutsamsten für die Modulation der Kontraktilität sind die Einwirkungen des cAMP/PKA-Signalweges auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase.

### 1.3 Pathophysiologie der Herzinsuffizienz

Die kurzfristige Aktivierung der neurohumoralen Systeme ist ein wichtiger Mechanismus, um die Förderleistung des Herzen den täglichen Anforderungen anzupassen. Eine chronische Aktivierung dieser Prozesse bei reduzierter Herzleistung führt jedoch längerfristig zu einem nachteiligen Effekt und eher zu einer progredienten Verschlechterung der Ventrikelfunktion. Es entsteht der so genannte *Circulus vitiosus*. Chronisch aktiviert rufen diese Mechanismen neben funktionellen Veränderungen auch molekulare und strukturelle Veränderungen hervor, beispielsweise die Entwicklung einer Herzhypertrophie und eines kardialen *Remodeling*. Vor allem das Zusammenspiel dieser Veränderungen trägt zur Progression einer Herzinsuffizienz bei.

Als eine bedeutende Ursache der Herzinsuffizienz ist die chronische Überstimulation des Sympathikus anzusehen. Durch dauerhaft erhöhte Adrenalin- und NoradrenalinKonzentrationen kommt es zu einer kompensatorischen Reduzierung der  $\beta_1$ -Adrenozeptordichte und infolge zu einer Desensibilisierung der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade (Bristow et al. 1982, Kaye et al. 1995, Lohse et al. 2003, El-Armouche und Eschenhagen 2008). In gesunden menschlichen Herzen beträgt das Verhältnis von  $\beta_1/\beta_2$  Rezeptoren sowohl im rechten als auch in dem linken Ventrikel 77/23. In insuffizienten Herzen hingegen liegt das Verhältnis bei 60/38 (Bristow et al.1986). Die Abnahme der  $\beta_1$ -Rezeptoren und der Anstieg der  $\beta_2$ -Rezeptoren in den insuffizienten Herzen tritt infolge einer selektiven *Downregulation* der  $\beta_1$ -Rezeptoren ein (Bristow et al.1986). Auch die mRNA Expression der  $\beta$ -Rezeptoren ist reduziert (Engelhart et al. 1996). Zudem wird die Desensibilisierung durch eine Entkopplung der  $\beta$ -Rezeptoren von ihren Signalwegen, genauer von den Gs-Proteinen und der erhöhten Expression von inhibierenden G-Proteinen begünstigt. Dadurch erfolgt eine Abschirmung vor Katecholaminen und somit eine Abschwächung der positiv inotropen

Wirkung des sympathikotonen Systems am Myokard.

Gegensinnig zur Herunterregulation der  $\beta$ 1-Adrenozeptoren erfolgt wahrscheinlich durch eine erhöhte PKA-Aktivität, eine Verschiebung des Gleichgewichts auf die Seite der Phosphorylierung. Marx et al. beobachteten eine Hyperphosphorylierung der RYR in insuffizienten Herzen, welche über ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck eine diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung ermöglichen. Es kommt zu einem Verlust des  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes des SR und zur Ausbildung von niedrigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten. Dieses  $\text{Ca}^{2+}$ -Ungleichgewicht ist die Hauptursache sowohl für Kontraktionsstörungen als auch für Arrhythmien. Neben dem Problem des vermehrten  $\text{Ca}^{2+}$ -Verlustes aus dem SR ist die gestörte diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in das SR eines der wichtigsten Kennzeichen der chronischen Herzinsuffizienz. Als Ursache ist vor allem eine verringerte Expression der SERCA2a anzusehen. Gleichzeitig ist die Expression von NCX gesteigert. Möglicherweise handelt es sich um einen kompensatorischen Mechanismus. Die Expression von PLB wird von einigen Forschungsgruppen als unverändert gesehen (Schwinger et al. 1999). Hasenfuss (1994) und Meyer (1995) et al. hingegen konnten eine leicht reduzierte Expression des PLB beobachten. Beim gesunden Herzen gelangt der überwiegende Anteil des zytosolischen Kalziums zu circa 92% bei Mäusen und etwa 70% beim Menschen über die SERCA2a zurück in das SR. Der  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  Austauschcarrier transportiert 7% bzw. 28% des Kalziums nach extrazellulär. Ein geringer Teil (1%) wird über einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Uniporter in die Mitochondrien eingeschleust (Bers et al. 2002). Bei der Herzinsuffizienz hingegen befördert die SERCA2a nur 50% des  $\text{Ca}^{2+}$  in das SR. Gleichzeitig ist die Funktion des NCX gesteigert und befördert circa 50% des  $\text{Ca}^{2+}$  nach extrazellulär (Pogwizd et al. 2001). Infolge des erhöhten Abtransportes nach extrazellulär steht dem SR weniger  $\text{Ca}^{2+}$  zur Verfügung, was mit einem niedrigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten während der Systole einhergeht. Dies stellt eine der zentralen Ursachen der systolischen Auswurfchwäche des insuffizienten Herzen dar (Bers et al. 2002). In diesem Kontext ist hervorzuheben, dass beide Systeme sowohl die SERCA2a als auch der NCX im Gleichgewicht vorliegen sollten, da ein Ungleichgewicht entweder zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Verlust oder zu einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung der Zelle führen würde.

## 1.4 Therapieansätze

Das Konzept der neurohumoralen Aktivierung bildet die Basis der medikamentösen Therapie der Herzinsuffizienz. Mittel der Wahl sind ACE-Hemmer, da sie die Prognose der chronischen Herzinsuffizienz verbessern. Die Gesamtmortalität unter den ACE-Hemmern sinkt um ca. 25% (Consensus Studie). Zusätzlich zur Standardtherapie mit ACE-Hemmern werden  $\beta$ -Blocker ab NYHA Stadium II-IV eingesetzt. Bei Patienten mit Zustand nach Herzinfarkt und Hypertonie erfolgt die Einnahme von  $\beta$ -Blockern schon ab Stadium I. Viele Studien haben den nützlichen Effekt von  $\beta$ -Blockern in der Behandlung von insuffizienten Herzen nachgewiesen (Bristow et al. 2000).  $\beta$ -Blocker senken die Mortalität bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz (Bristow et al. 2000, Satwani et al. 2004), führen zu einem Rückgang des *Remodeling* (Mudd et al. 2007) und verbessern über einen längeren Zeitraum die systolische Pumpfunktion (Hall et al. 1995). Trotz der bewiesenen Effizienz des Einsatzes der  $\beta$ -Blocker bei Patienten mit moderater Herzinsuffizienz und primärer oder sekundärer Kardiomyopathien ist es wichtig, zu betonen, dass  $\beta$ -Blocker Limitationen aufweisen. Zum einen sind die Kontraindikationen zu erwähnen, wie unter anderem das Asthma, der AV-Block und die akute dekompensierte Herzinsuffizienz. Ein weiteres Problem ist die zu Beginn eintretende Blutdrucksenkung und Bradykardie. Der dritte Nachteil ist, dass neben der individuellen Anpassung der Medikamentendosen für die  $\beta$ -Blocker Metoprolol und Carvedilol bei Individuen mit CYP 2D6 Gen Polymorphismus (Rau et al. 2002), einige Patienten nicht auf die Therapie mit  $\beta$ -Blocker ansprechen und es somit zu keiner Besserung der myokardialen Funktion und Mortalität kommt. Diese Individuen zeigten ein schlechteres *Outcome* als Patienten, die mit einem Placebo behandelt wurden (Bristow et al. 2000 und Lechat et al. 1997).

Patienten mit einer Herzinsuffizienz haben trotz der neurohumoralen Aktivierung eine erniedrigte myokardiale Pumpfunktion. Mit dem Ziel eine wesentliche Verbesserung der Kontraktilität zu erreichen, wurden im 18. Jahrhundert Inotropika zur Behandlung der Herzinsuffizienz (Hasenfuss et al. 2011) eingeführt. Geläufige inotrope Substanzen sind Herzglykoside,  $\beta$ -Adrenozeptor Agonisten, PDE-

Hemmer und Kalzium-Sensitizer. Laut den aktuellen Leitlinien der deutschen Gesellschaft für Kardiologie hat sich allerdings als einzige positiv inotrope Substanz der Einsatz von Herzglykoside (Digitalis) zur Therapie der Herzinsuffizienz ab dem NYHA Stadium III bewährt. Patienten mit Vorhofflimmern können zur Frequenzkontrolle bereits ab Stadium I eine Therapie mit Digitalis erhalten. Insgesamt kommt es zu einer verringerten Hospitalisierungsrate (Radiance-Studie) und einem verbesserten Wohlbefinden der Patienten unter einer Therapie mit Digitalis, jedoch ohne Einfluss auf die Gesamtsterblichkeit.

Patienten mit einer akuten Herzinsuffizienz sollen entsprechend den Leitlinien bei einem Blutdruck unter 90 mmHg und dem Nachweis eines reduzierten kardialen *Outputs* mit Zeichen der Hypoperfusion der Organe eine Therapie mit inotropen Medikamenten erhalten. In der Therapie der chronischen Herzinsuffizienz wird der Einsatz aller anderen positiv inotropen Substanzen außer der Herzglykoside (siehe oben) als Standardtherapie nicht empfohlen, da sie mit einer erhöhten Mortalität assoziiert sind. Katecholamine erweisen sich zudem als ineffektiv aufgrund der  $\beta$ -adrenergen Desensibilisierung bzw. Herunterregulierung (El-Armouche und Eschenhagen 2008, Lohse et al. 2003). Sowohl bei den  $\beta$ -Agonisten als auch bei den PDE-Hemmern kommt es zu einem Anstieg des cAMP-Spiegels und damit konsekutiv zu einer Anreicherung von  $\text{Ca}^{2+}$  im Zellinneren, welches gleichzeitig eine erhöhte Anfälligkeit für Arrhythmien bedingt. Hingegen erhöhen Kalzium-Sensitizer die Kontraktilität ohne den intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt zu steigern. Der Wirkmechanismus beruht auf einer stärkeren Affinität des Troponin C für  $\text{Ca}^{2+}$  (Hasenfuss et al. 2011). Leider zeigten neue klinische Studien eine erhöhte Sterberate unter dem vielversprechenden Kalzium-Sensitizer Levosimendan (Goldhaber und Hamilton et al. 2010). Obwohl die zunächst vielversprechenden positiv inotropen Substanzen in der Therapie der chronischen Herzinsuffizienz erfolglos waren, scheint es naheliegend zu sein, dass eine Zunahme der linksventrikulären Funktion eine Progression der Erkrankung aufhält und das klinische *Outcome* verbessert. Verdeutlicht wird dies durch den Einsatz der kardialen Resynchronisationstherapie mittels koordinierter elektrischer biventrikulärer Stimulation, die die Herzpumpfunktion und das Überleben erhöht (Hasenfuss et al. 2011, Cleland et

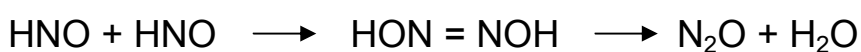
al. 2005). Es besteht somit ein Bedarf an inotropen Medikamenten, welche die bisherigen Einschränkungen und Nebenwirkungen umgehen. Eine neue Herangehensweise die kardiale Funktion zu verbessern, könnte durch den Einsatz von HNO erfolgen.

## 1.5 Chemie von HNO

HNO ist die durch ein Elektron reduzierte und protonierte Form von NO. In Folge der Modulation dieses einen Elektrons resultieren Effekte die unterschiedlich sind, zu denen von NO. Im Folgenden Abschnitt werden die wichtigsten chemischen Eigenschaften von HNO dargestellt, die für die Erforschung des Moleküls bedeutsam sind.

Eine Reihe neuer Studien haben gezeigt, dass HNO eine schwache Säure mit einem pKa-Wert von größer 11 ist (Wink et al. 2003, Fukuto et al. 2008, Paolocci et al. 2007). Daher wird angenommen, dass HNO und nicht die konjugierte Base  $\text{NO}^-$  im physiologischen pH-Bereich vorliegt. Die Einstellung eines Säure/Basen Gleichgewichts ist unwahrscheinlich, da die Säure und ihre korrespondierende Base unterschiedliche *spin states* besitzen. Dies bildet eine kinetische Barriere für einen möglichen Protonentransfer, denn es ist für HNO im Hinblick auf die Quantenmechanik ungünstig in den  $\text{NO}^-$  Status überzugehen (Tripletzustand vs. Singulettzustand). Daraus folgt, dass nahezu ausschließlich die biochemischen Effekte der Ausgangsspezies wirksam werden (Fukuto et. al 2008).

HNO zeigt eine hohe Reaktivität. Es reagiert zum einen mit sich selbst in einer sogenannten Dimerisierungsreaktion bei der Distickstoffmonoxid ( $\text{N}_2\text{O}$ ) und Wasser ( $\text{H}_2\text{O}$ ) entstehen, aber auch im biologischen System gibt es viele Angriffspunkte.

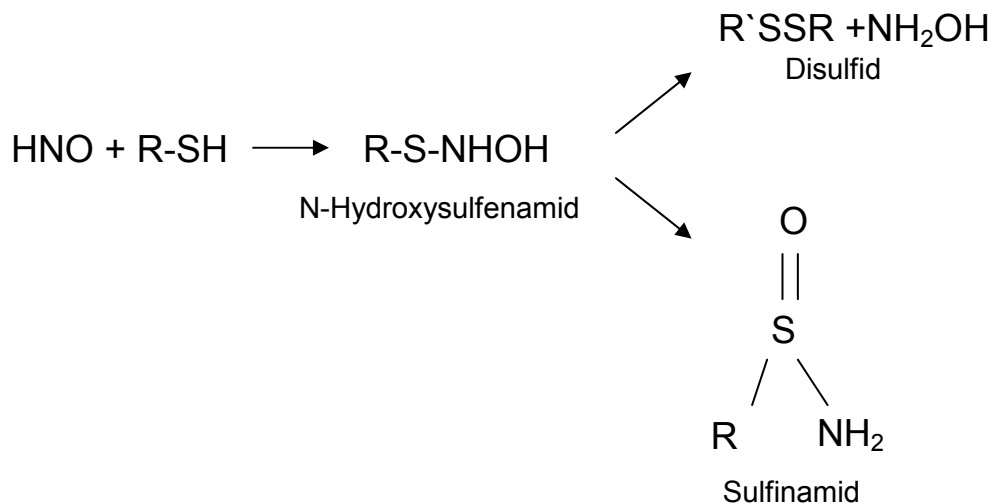


**Abb. 1.2:** Dimerisierungsreaktion von HNO.



Die zwei Hauptangriffsziele sind Metalle und Thiole, welche in zahlreichen Proteinen vorkommen. Die Modulation von thiolhaltigen Enzymen mittels HNO ist von Studien über Cyanamid bekannt (siehe 1.4). HNO wirkt auch hemmend auf andere thiolhaltige Enzyme, darunter die mitochondrialen Komplexe I und II. Darüber hinaus interagiert es mit Thiol-Resten auf Rezeptoren oder Ionenkanälen wie beispielsweise dem RYR1 und RYR2 (Tocchetti et al. 2011). Dies scheint der hauptsächlichste Mechanismus für die pharmakologische Wirkung von HNO zu sein und ermöglicht eine Unterscheidung zwischen den Effekten von HNO und NO, da dieses keine direkte Reaktion mit Thiolen zeigt.

Die Reaktion von HNO mit Thiolen kann zu zwei unterschiedlichen Produkten führen. In Gegenwart von hohen Thiolkonzentrationen bilden sich die reversiblen Produkte Disulfid und Hydroxylamin. In der Abwesenheit von anderen Thiolen entsteht das irreversible Produkt Sulfinamid. Unter allen Stickstoffoxiden wird Sulfinamid nur durch HNO generiert. Dies könnte als möglicher Marker für die Reaktivität von HNO dienen (Donzelli et al. 2006).



**Abb. 1.3:** Reaktion von HNO mit Thiolen.

Ein wichtiges metallhaltiges Protein, mit dem HNO höchstwahrscheinlich interagiert, ist die hämhaltige lösliche Guanylylcyclase (sGC), welches in Folge die Bildung von cGMP stimuliert (Irvine et al. 2008). HNO wirkt dabei reduzierend auf das dreiwertige Eisen ( $\text{Fe}^{3+}$ ) im Häm. Ebenso reduziert werden die Me-

talle Kupfer und Mangan.

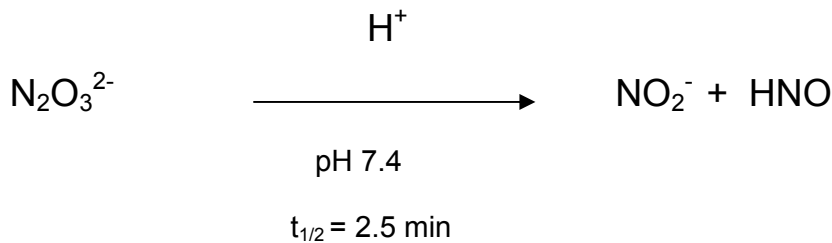
NO ist ein endogen produziertes Signalmolekül hingegen ist die endogene Produktion von HNO in Säugetieren derzeit unklar (Irvine et al. 2008, Tocchetti et al. 2011). Erschwert wird dies durch den Mangel an direkten Detektionsmethoden für HNO unter anderem aufgrund seiner Metastabilität und hohen Reaktionsfreudigkeit. Indirekte Methoden zur Erfassung von HNO sind bereits entwickelt worden wie beispielsweise die Messung von  $N_2O$ , dem Dimerisierungsprodukt von HNO. Verschiedene *in vitro* Ergebnisse weisen auf mögliche Zustände hin, unter denen es zur Generation von HNO kommen kann. Es wird angenommen, dass HNO sowohl direkt durch die NO-Synthase (NOS) als auch NOS unabhängig gebildet werden kann (Irvine et al. 2008). Dies ist jedoch spekulativ und es bleibt weiterhin zu klären, ob HNO endogen gebildet wird (Irvine et al. 2008, Fukuto et al. 2008, Paolocci et al. 2007).

## **1.6 HNO-Donatoren**

Aufgrund seiner flüchtigen Natur und der häufig auftretenden Dimerisierungsreaktion (s. Abb. 1.2) ist der Gebrauch von HNO-Donatoren erforderlich (Fukuto et al. 2008). Es gibt unterschiedliche Klassen von HNO-Donator Molekülen. Bis heute ist der meist verwendete Donator das Dinatriumtrioxodinitrat ( $Na_2N_2O_3$ ), welches auch unter dem Namen *Angeli's Salz (AS)* bekannt ist. Die Kenntnisse der biologischen Aktivität von HNO sind größtenteils über die Freisetzung aus AS ermittelt worden.

AS setzt HNO mit einer kurzen Halbwertszeit von 2-3 min bei einem physiologischen pH-Wert und einer physiologischen Körpertemperatur von 37°C frei. Der pH-Bereich liegt dabei zwischen 4-8. Ein Nachteil bewirkt die schnelle Freisetzung von HNO, welche eher einem Bolus als einer kontinuierlichen Abgabe entspricht. Die Dekompensation von AS führt neben der Bildung von HNO zu einer äquivalenten Menge an Nitrit ( $NO_2^-$ ). Die gleichzeitige Nitritfreisetzung ist ein Störfaktor bei der Erforschung der HNO-Effekte (Switzer et al. 2009, Gladwin et al. 2005), jedoch konnten Kohr et al. (2010) beweisen, dass Nitrit zumindest auf die Sarkomerlängenverkürzung und auf die Kalziumtran-

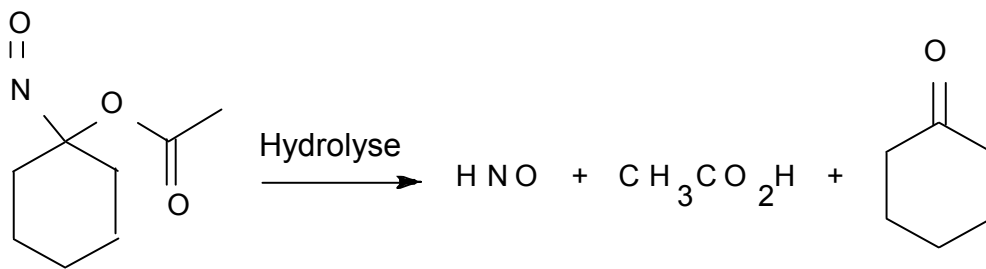
sienten keine Wirkung zeigte. Bei einem pH-Wert unter 4 wird AS zu einem NO-Donator. Im alkalischen Milieu ist AS stabil, deshalb wird es meist in NaOH gelagert. Bedenklich ist der Einsatz von AS im biologischen System unter anderem auch aufgrund des stark alkalischen pH-Wertes des Lösungsmittels NaOH (Fukuto et al. 2008, Paolucci et al. 2007).



**Abb. 1.4:** HNO-Donator Angeli's Salz.

Ein in der Klinik gebrauchter HNO-Donator ist Cyanamid, das zur Therapie der Alkoholabhängigkeit eingesetzt wird. Das dabei freigesetzte HNO greift die Thiolgruppen des alkoholabbauenden Enzyms (Aldehyd-Dehydrogenase) an und wirkt dadurch hemmend (DeMaster EG et al. 1998, Paolucci et al. 2007). Cyanamid zeigt die mögliche Durchführbarkeit des klinischen Gebrauches von HNO-Donatoren.

Eine neue Klasse von HNO-Donatoren stellen die *Acyloxy-Nitroso-Compounds* dar, darunter das 1-Nitrosocyclohexyl Acetat (NCA). NCA setzt HNO kontinuierlich bei einem physiologischen pH-Wert frei. Die Dekompensation erfolgt dabei entweder spontan über Hydrolyse oder mittels Esterase-Aktivität. Vorteilhafterweise kann die Abgaberate durch eine Modifizierung der organischen Gruppen am Molekül variiert und gesteuert werden. Im Gegensatz zu AS kommt es bei den Reaktionen zu keiner Nitrit-Freisetzung. Charakteristisch für NCA ist die tiefblaue Farbe, daher auch als *Blue Compound* bezeichnet, welche beim Monitoring hilfreich sein kann (Sha X et al. 2006, Irvine et al. 2008, Paolucci et al. 2007). Diese günstigen Eigenschaften bieten eine gute Grundlage für die *in vivo* Applikation als auch einen potentiell klinischen Gebrauch dar.



**Abb. 1.5:** HNO-Donator 1-Nitrosocyclohexyl Acetat.

## 1.7 HNO Effekte auf das kardiovaskuäre System

HNO zeigt vielfältige Effekte unter anderem auf die neuronale Funktion, auf die Herzkreislauffunktion, in der Tumorthherapie und in der Alkoholtherapie. Angesichts des Themas der Dissertation wird auf weitere Wirkungen von HNO, neben den kardiovaskulären Effekten, an dieser Stelle nicht näher eingegangen.

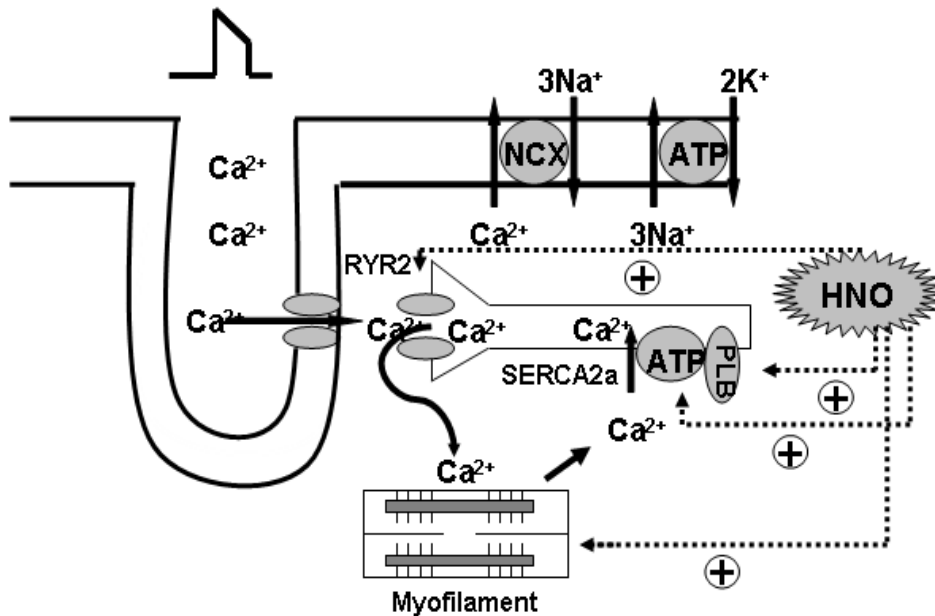
HNO-Donatoren sind ähnlich wie NO-Donatoren potente Vasodilatoren *in vitro* und *in vivo*. HNO induziert eine Relaxation in den Kapazitätsgefäßen und in den Widerstandsgefäßen von Hunden und Nagetieren (Fukuto et al. 1992 und Paolucci et al. 2003). Es wirkt somit auf das venöse und das arterielle System (Bullen et al. 2011). Als molekularer Mechanismus der Vasodilatation von HNO wird eine cGMP-Aktivierung sowie eine Modulation von spannungsabhängigen Kalium-Kanälen vermutet (Favaloro et al. 2009 und Irvine et al. 2003). Im Gegensatz zu NO beobachteten Irvine et al. (2007) unter chronischer Hinzugabe von HNO an isolierten Aorten von Ratten keine Toleranzentwicklung. Zusätzlich interessante HNO-Effekte sind eine Inhibition der Plättchenaggregation (Bermejo et al. 2005).

Gleichzeitig zeigt HNO vor allem vielversprechende Wirkungen auf die Herzfunktion. Neben den oben genannten Eigenschaften kommt es zu einer erhöhten Kontraktilität und Erschlaffung des Herzen. Als erstes wurde dies von Paolucci et al. (2001) mit dem HNO-Donator AS erforscht. Sie überprüften die Wirkung von HNO an einem *in vivo* Hundeherzinsuffizienzmodell, welches mittels chronisch tachykarder Stimulation induziert wurde. HNO zeigte einen Kontraktilitätsanstieg sowohl in normalen als auch insuffizienten Herzen trotz der dabei bestehenden  $\beta$ -adrenergen Desensibilisierung und der Herunter-

regulation des Kalzium Signalweges (Paolocci et al. 2003). Es zeigte sich auch, dass die positiv inotrope und gleichzeitig lusitrope Wirkung von HNO unabhängig vom Preload und Afterload war (Paolocci et al. 2001 und 2007). Zudem wurde aus den Experimenten deutlich, dass die Kontraktilität von HNO nach Verabreichung von  $\beta$ -Blockern nicht abgeschwächt wurde. Interessanterweise beobachtete man sogar einen additiven Effekt hinsichtlich der Steigerung der myokardialen Inotropie bei der simultanen Gabe von HNO und  $\beta$ -Agonisten wie Dobutamin. Im Gegensatz dazu bewirkte NO, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von anderen Arbeitsgruppen, eine Abschwächung der Dobutamin induzierten Kontraktionssteigerung (Paolocci et al. 2003, Massion et al. 2005).

Als Wirkmechanismus dieser Effekte wird eine Aktivierung des RYR2 und der SERCA2a vermutet, woraus eine erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Abgabe bei gleichzeitiger Beschleunigung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in das SR resultiert (siehe Abb. 1.6). Zu betonen ist, dass der Kontraktionsablauf dabei ohne netto Anstieg des diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$  erfolgt (Tocchetti et al. 2007). Ferner wirkt HNO auch auf die skelettalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (RYR1) stimulierend (Cheong et al. 2005). Studien von Tocchetti et al. (2007) verdeutlichen, dass HNO über eine direkte Interaktion mit den Thiolgruppen des RYR2 zu einer erhöhten Offenwahrscheinlichkeit führt und in Folge dessen zu einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR. Das extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ , welches über die L-Typ Kanäle ins Zytosol einströmt, scheint keine Rolle zu spielen (Kohr et al. 2010). Letztendlich verhält sich HNO vor allem in den Tierexperimenten als Verstärker der  $\text{Ca}^{2+}$ -Zirkulation, indem es vorzugsweise einen Einfluss auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt des SR hat (Tocchetti et al. 2011). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Wiederaufnahme wird durch Stimulierung des ATP abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportes in das SR beschleunigt. Mechanistisch wird dies mit der Modulation des Cysteinrestes auf der SERCA (Cystein 674) in Zusammenhang gebracht, woraus eine gesteigerte Aktivität resultiert (Lancel et al. 2009). Darüber hinaus kann die SERCA2a Aktivität durch Modulation des PLB beeinflusst werden. Froehlich et al. (2008) befassten sich mit der Frage, ob HNO auch hier ein Angriffsziel hat und fanden heraus, dass es über eine Interaktion mit Thiolen in der Struktur des PLB den inhibierenden Einfluss auf die SERCA2a regulieren bzw. diese enthemmen kann. Zusätzlich zu den Effekten auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Zirku-

lation, moduliert HNO den Kontraktilitätsanstieg durch eine Änderung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität der Myofilamente (Dai et al.2007).



**Abb. 1.6:** Effekte von HNO auf die elektromechanische Kopplung: Die Modifikation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Zirkulation über HNO erfolgt via Interaktion mit den Komponenten der elektromechanischen Kopplung wie z.B. Ryanodin-Rezeptoren (RyR2), Phospholamban (PLB),  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase des Sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA2a) und den Myofilamenten (Myosin Leichtketten 1 (MLC1) und Myosin schwere Ketten (MHC)).

In Übereinstimmung zu den *in vivo* Versuchen zeigen viele Messungen an isolierten Kardiomyozyten von Mäusen und Ratten unter Zugabe von HNO eine gesteigerte Verkürzungsrate und eine beschleunigte Entspannung sowie einen insgesamt vergrößerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten ohne einen Anstieg des diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes (Kohr et al. 2010, Lancel et al. 2009, Tocchetti et al. 2007). Die Effekte von HNO sind vollkommen reversibel durch die Zugabe von reduzierend wirkenden Mitteln wie Dithiothreitol (DTT) und steigern die Inotropie unabhängig vom cAMP/PKA und cGMP/PKG Signalweg (Tocchetti et al. 2007, Tocchetti et al. 2011, Paolucci et al. 2007). Vielmehr unterstreichen viele Daten und Ergebnisse, dass Thiole und darunter eher Thiolate Angriffspunkte zu sein scheinen, welche in Cysteinresten von diversen Proteinen vorkommen, die entscheidend für die elektromechanische Kopplung sind (Tocchetti et al. 2011, Flores-Santana

et al. 2011). Forschungsgruppen erforschen weiterhin welches die ausschlaggebenden HNO/Thiolat Interaktionen oder *hot spots* sind, um den Mechanismus der HNO Wirkung besser zu verstehen.

## **1.8 Fragestellung**

Bisherige Studien mit HNO-Donatoren haben günstige pharmakologische Wirkungen von HNO aufgezeigt. Ein vielversprechendes Potenzial offenbart HNO im Hinblick auf die Therapie der Herzinsuffizienz. Viele HNO-Donatoren zeigen allerdings Limitationen für den *in vivo* Einsatz, sodass ein Bedarf an neuen Donatoren besteht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Wirkungen von HNO an einem normalen und an einem pathologischen Herzmodell der Maus mit dem neuen HNO-Donator NCA zu erforschen. Im Mittelpunkt der Herzinsuffizienzforschung stehen die Veränderungen der elektromechanischen Kopplung und der Kalzium-Homöostase, welche zu Funktionseinschränkungen führen können. Die Effekte von HNO werden deshalb hinsichtlich der kontraktilen Funktion und der intrazellulären Kalziumtransienten aufgezeigt.

### **Hierzu wurden folgende Fragen überprüft:**

- Hat der neue HNO-Donator NCA das Potenzial zur Steigerung der Kontraktilität in hypertrophierten,  $\beta$ -adrenerg desensibilisierten Kardiomyozyten?
- Welchen Effekt zeigt Isoprenalin auf die Kontraktilität ventrikulärer Kardiomyozyten aus chronisch  $\beta$ -adrenerg stimulierten Herzen?
- Welche Wirkung hat NCA auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Zirkulation?
- Kommt es zu einer Veränderung des SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes unter dem Einfluss von NCA?

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Mauslinie**

Als Versuchstiere wurden männliche Wildtyp-Mäuse der Linie C57Bl/6J verwendet, die zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung 12-16 Wochen alt waren. Für die Tierversuche liegt eine Genehmigung der Behörde der Freien und Hansestadt Hamburg vor (Amt für Gesundheit und Verbraucherschutz G21-46/04).

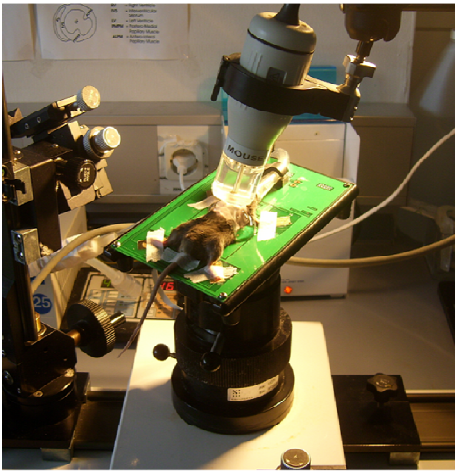
### **2.2 Implantation osmotischer Minipumpen**

In den durchgeführten Versuchsreihen wurde eine durch Isoprenalin induzierte kardiale Hypertrophie als Herzinsuffizienzmodell verwendet. Zur chronischen Applikation von Isoprenalin (Sigma; 30 mg/kg\*Tag) in der Maus, wurden osmotische Minipumpen mit einer Abgaberate von 0,5 µl/h verwendet (Alzet, Modell 1007d). Isoprenalin wurde in 0,9% NaCl mit 0,2 mM HCl bei Raumtemperatur gelöst. Anschließend wurde jede Pumpe individuell, dem Gewicht des Tieres entsprechend, befüllt. Die Pumpen der Kontrollmäuse wurden hingegen nur mit 0,9% NaCl und 0,2 mM HCl befüllt. Um vor der Implantation eine konstante Abgaberate zu erzielen, wurden die Pumpen nach der Befüllung für 10-14 Stunden bei 37 °C in 0,9% NaCl vorinkubiert.

Nach Anästhesie der Mäuse mit Isofluran (3 vol%) wurden die Minipumpen subkutan über eine Hautinzision (0,7 cm) im Nacken in den Lendenwirbelbereich implantiert. Anschließend erfolgte der Verschluss der Haut mit 2-3 Michel-Klammern. Zur Analgesie erhielten die Tiere über zwei Tage lang 5,4 mg Metamizol (Novaminsulfon-ratiopharm®, Ratiopharm) pro Tag. Nach Ablauf der Behandlungsdauer wurden die Tiere zunächst sonographisch untersucht und anschließend wurde das Herz entnommen (siehe 2.4).



## 2.3 Echokardiographie



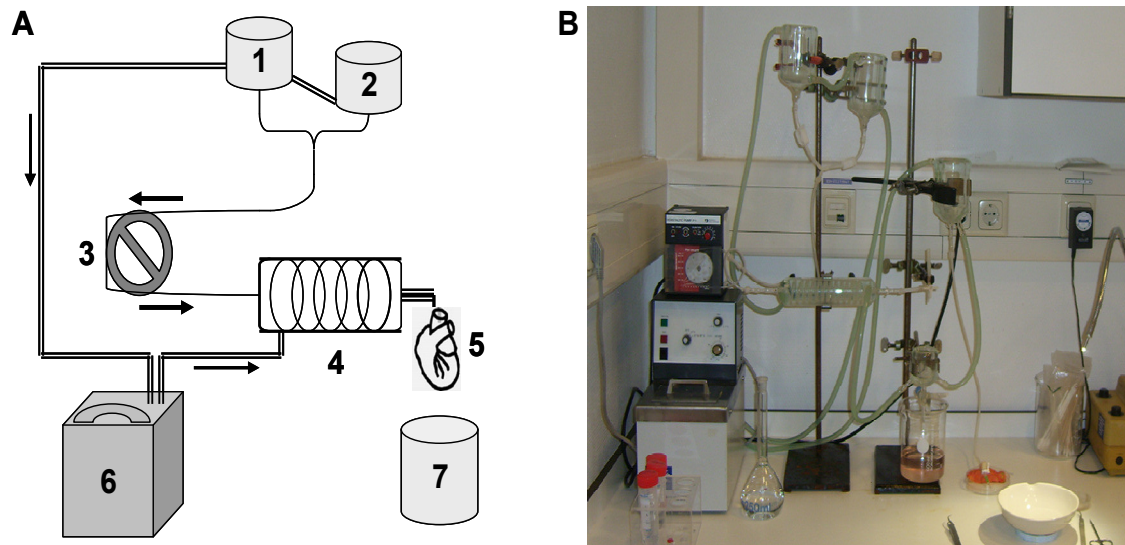
Alle echokardiographischen Untersuchungen wurden von Herrn Thomas Schulze (Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Hamburg) durchgeführt und ausgewertet. Sowohl die Messungen als auch die Auswertungen erfolgten verblindet.

**Abb. 2.1:** Maus im Echokardiographie-Raum.

Die Ultraschalluntersuchungen wurden mit dem Vevo 770® System (Visual Sonics, Toronto) mit einem 30 MHz Schallkopf durchgeführt. Zur Einleitung der Narkose wurde die Maus in eine Induktionskammer mit Isofluran (3 vol%) gesetzt. Anschließend wurde die anästhesierte Maus in Rückenlage auf eine Wärmeplatte gelegt und mit den Pfoten auf EKG-Elektroden fixiert. Die Messungen erfolgten bei einer Herzfrequenz von 450-550 Schlägen/min und die Körpertemperatur wurde konstant bei 37 °C gehalten. Die Aufrechterhaltung der Narkose wurde mit Hilfe einer Gesichtsmaske (1-2 vol% Isofluran, 1,5 l/min Carbogen) gewährleistet. Der Brustkorb wurde enthaart und mit vorgewärmtem Ultraschallgel (Sonogel, Bad Camberg) bedeckt. Mit einer *Frame rate* von 60 Hz wurde zunächst im B-Mode die parasternale lange Achse des Herzens dargestellt. Sichtbare Strukturen waren hierbei die Herzspitze, der linke Ventrikel und dessen Übergang in die Aorta, das interventrikuläre Septum und der rechte bzw. linke Vorhof. Anschließend wurde der linke Ventrikel in der parasternalen kurzen Achse auf der mittleren Ebene der Papillarmuskeln aufgenommen. Die Ebene diente auch der Erstellung von M-Mode Aufnahmen. Zusätzlich wurden Kurz- und Langachse als EKV®-Mode aufgenommen. Bei dem EKV handelt es sich um eine Technik, bei der eine hohe Anzahl von Schlägen zu einem summiert wird. Gemessen wurden verschiedene Parameter sowohl in der Systole als auch in der Diastole. Die Messungen erfolgten mit dem Vevo 770 V2.2.3 Messprogramm.

## **2.4 Isolation von intakten Kardiomyozyten der Maus**

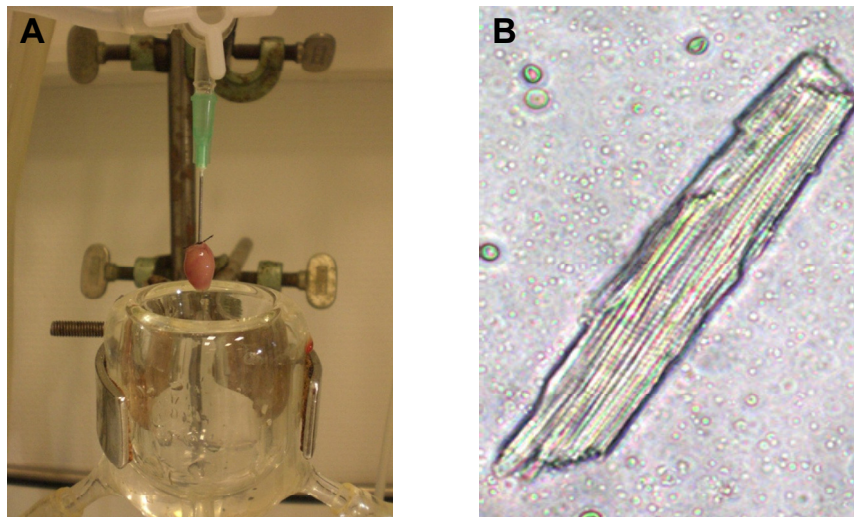
Die Isolation von Kardiomyozyten aus ventrikulärem Herzmuskelgewebe der Maus wurde mit Hilfe einer enzymgesteuerten Perfusion entsprechend einem modifizierten Protokoll von O'Connell (O'Connell T et al. 2003) vorgenommen. Dem Versuchstier wurde 5-10 Minuten vor der Tötung intraperitoneal Heparin (0,05 ml einer 10.000 IU/ml Stammlösung = 500IU) injiziert, um die Bildung von Blutgerinnseln in den Koronararterien zu verhindern und eine verbesserte Perfusion der Herzen zu ermöglichen. Eine Anästhesie mit Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>) wurde durchgeführt und anschließend erfolgte die Tötung der Tiere mittels Genickbruch. Der Thorax wurde nach Fixierung des Sternums durch einen horizontalen Schnitt im xyphoido-sternocostalen Winkel eröffnet und der Zugang durch zwei laterale Entlastungsschnitte erweitert. Nach Auffinden der Aorta wurde diese 2mm oberhalb der Aortenwurzel im Bereich der aufsteigenden Aorta durchtrennt und aus dem Mediastinum entnommen. Mit Hilfe von zwei feinen *curve-tip* Pinzetten (Dumont #7 0,007 mm x 0,04 mm, Fine Science Tools, USA) wurde eine Kanüle in das Lumen der übrig gebliebenen Aorta eingeführt und diese mit einem Faden fixiert. Das Herz wurde anschließend in ein temperiertes Perfusionssystem überführt (Abb. 2.2 und 2.3).



**Abb. 2.2:** Perfusionssystem zur Isolation von ventrikulären Kardiomyozyten. (A) Schematische Darstellung der Anlage: 1 und 2 Pufferbehälter mit Außenwandgaswasserheizer; 3 Peristaltische Pumpe; 4 Spule mit Außenwandgaswasserheizer; 5 adultes Mäuseherz; 6 Wasserbad; 7 Becherglas (B) Fotografische Aufnahme der Perfusionsanlage.

Der Erhalt von möglichst vielen intakten Kardiomyozyten für die nachfolgenden Versuche setzte eine vorzugsweise geringe Zeitspanne (2-3 Minuten) zwischen der Tötung des Versuchstieres und den Zeitpunkt des Puffereintritts in die Koronargefäße voraus. Eine konstante Temperatur von 37 °C am Kanülenaustritt und eine konstante Flussgeschwindigkeit von 3 ml/min garantierten reproduzierbare Versuchsbedingungen. Das Herz wurde für 8 Minuten mit einem Kalzium freien Puffer (in mM: 113 NaCl, 4,7 KCl, 0,6 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,6 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,2 MgSO<sub>4</sub>, 12 NaHCO<sub>3</sub>, 10 KHCO<sub>3</sub>, 10 HEPES (pH 7,46), 30 Taurin, 10 2,3-butandion monoxim (BDM), 5,5 Glucose) perfundiert. Es folgte eine neunminütige Perfusion mit einem Verdauungspuffer, welcher zusätzlich 0,1 mg/ml von rekombinanten Kollagenasen/Proteasen (Liberase Blendzyme 3, Roche Diagnostics) und 12,5 µM CaCl<sub>2</sub> enthielt. Anschließend wurden die Herzkammern unterhalb der Vorhöfe abgetrennt und in 2,5 ml Verdauungspuffer überführt. Das Herzmuskelgewebe wurde nun mit Hilfe von Pinzetten zerkleinert. Eine weitere Verdauung durch die noch vorhandene Enzymaktivität wurde durch die Hinzugabe von Perfusionspuffer, mit zusätzlich 10% fetalem

Kälberserum und  $12,5 \mu\text{M CaCl}_2$ , verhindert. Das Debris wurde für einige Minuten der Sedimentation durch die Schwerkraft überlassen. Der Überstand, welcher die intakten Kardiomyozyten enthielt, wurde zentrifugiert (1 Minute bei  $180 \times g$ ). Das entstandene Pellet wurde in frischem Perfusionspuffer resuspendiert, welcher zusätzlich 5% fetales Kälberserum und  $25 \mu\text{M CaCl}_2$  enthielt.



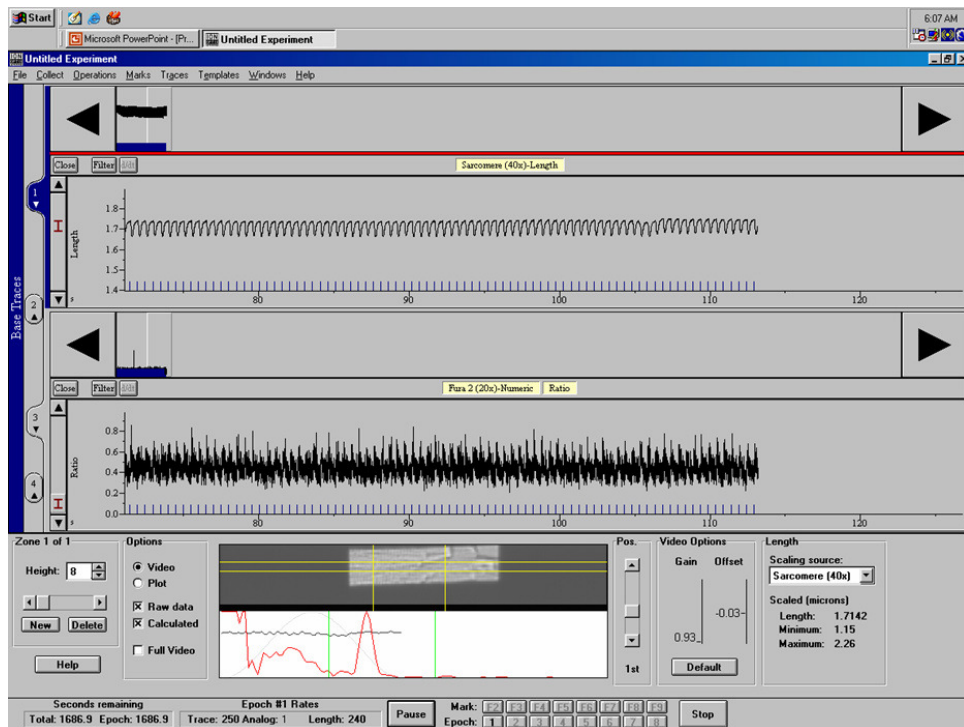
**Abb. 2.3:** *Adultes Mäuseherz während der Perfusion (A) und eine Kardiomyozyte isoliert aus ventrikulärem Herzmuskelgewebe des adulten Mausherzen (B).*

Die schrittweise Erhöhung der Kalziumkonzentration durch Zugabe von  $\text{CaCl}_2$  ( $12,5 \mu\text{M} \rightarrow 62 \mu\text{M} \rightarrow 112 \mu\text{M} \rightarrow 212 \mu\text{M} \rightarrow 500 \mu\text{M} \rightarrow 1\text{mM}$ ), 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  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,6  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,2  $\text{MgSO}_4$ , 10 HEPES (pH 7,46), 1,25  $\text{CaCl}_2$ , 20 Glucose) verdünnt.

## **2.5 IonOptix System- Datenerfassung und Analyse**

Mit Hilfe des IonOptix Systems (IonOptix Corporation, Milton, MA, USA) war es möglich die Kontraktilität und die Kalziumströme von den isolierten Kardiomyozyten simultan aufzuzeichnen (Abb. 2.4). 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. 2.4:** Computerbildschirm des Akquisitionsprogramms mit simultaner Aufzeichnung der Kontraktilität und der Kalziumströme einer stimulierten Kardiomyozyte (1 Hz, 15 mV). Die mit der MyoCamTM aufgenommene Videoaufzeichnung der Kardiomyozyte ermöglicht die Erfassung der Sarkomerlänge während das von Fura-2, einem  $Ca^{2+}$  sensitivem Farbstoff, emittierte Licht mit einem Photo Multiplier Tube gemessen wird.

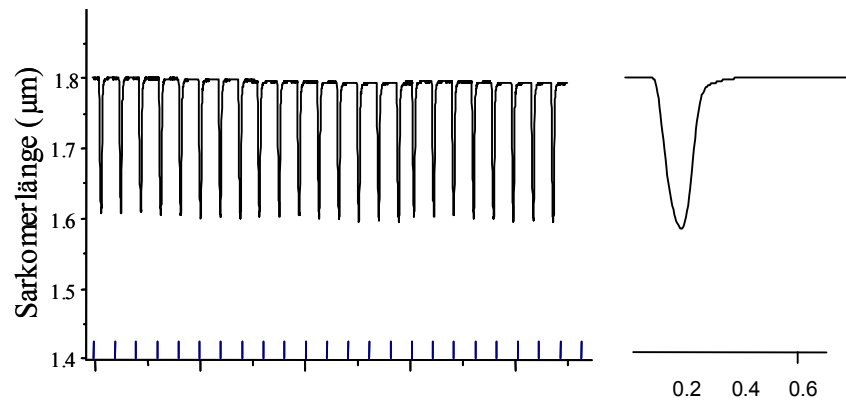
### 2.5.1 Versuchsaufbau

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 Messkammer (Cell MicroControls, Norfolk, VA, USA) ohne gegenseitige Überlagerung verteilen konnten. Die Messkammer wurde mit 400  $\mu$ l der Zellsuspension beladen und anschließend auf dem Objektisch eines invertierten Mikroskops (Nikon Eclipse TS 100) befestigt. Die elektrische Stimulation der Kardiomyozyten erfolgte durch zwei Iridiumelektroden, welche mit einem Feld-

stimulator (MyoPacer, IonOptix Corporation, Milton, MA, USA) verbunden waren. Die Zellen wurden mit einer Frequenz von 1 Hz bei 15 V und 4 ms Pulsdauer erregt. Alle Versuche mit dem IonOptix System wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Kardiomyozyten wurden nach folgenden Kriterien ausgewählt: (i) stabförmige Zellen mit einem klaren gestreiften Muster, (ii) keine sichtbaren Membranschäden oder Vakuolen in der Membran, (iii) keine hyperkontraktilen Zonen oder Zonen mit Spontankontraktionen, (iv) eine stabile Kontraktionsamplitude, (v) eine konstante diastolische Länge zwischen 1,75 und 1,8  $\mu\text{m}$ . Erfüllte eine Zelle alle Kriterien, wurde mit dem entsprechenden Experiment gestartet.

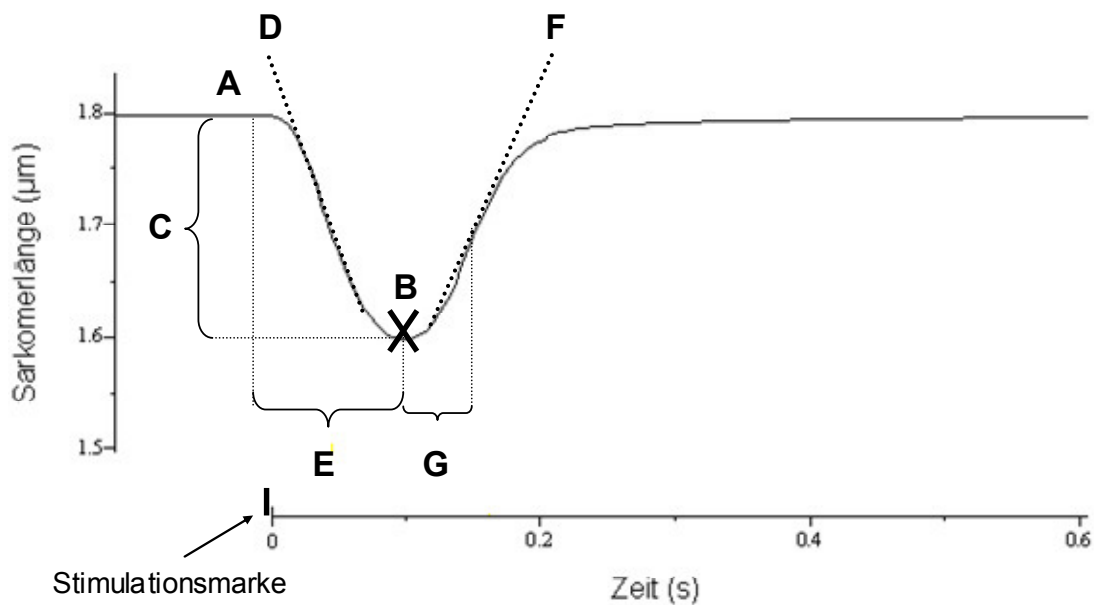
### **2.5.2 Sarkomerlängenmessung**

In Skelett- und Herzmuskelzellen sind die dünnen Aktinfilamente und die dicken Myosinfilamente charakteristisch angeordnet. Unter dem Lichtmikroskop wurden sie durch unterschiedliche optische Eigenschaften als Bandstreifenmuster mit abwechselnden hellen und dunklen Banden sichtbar. Aufeinanderfolgende helle und dunkle Banden, so genannte Sarkomere, ergaben bei der Analyse der optischen Dichte sinusförmige Kurven. Die Wellenlänge der Sinuskurve repräsentierte die Sarkomerlänge. Die optische Dichte wurde bei den Versuchen von einer Kamera (IonOptix Myo-Cam™, IonOptix Corporation, Milton, MA, USA) aufgezeichnet, welche anschließend durch die IonWizard 5.0 Software mit Hilfe eines *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 simultan registriert. Die Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe der IonWizard 5.0 Software. Dazu wurde der Mittelwert von 20-30 aufeinander folgenden Kontraktionen einer Zelle ermittelt (Abb. 2.5). Aus der gemittelten Kontraktionskurve wurden dann die einzelnen Kurvenparameter bestimmt (Abb. 2.6).



**Abb. 2.5:** Repräsentative Aufnahme einzelner Kontraktionen (links) und gemittelte Sarkomerlängen-Kurve aus den 20-30 einzelnen Kontraktionen (rechts).

### 2.5.3 Zusammenstellung der Kurvenparameter der Sarkomerlängenmessung



**Abb. 2.6:** Kurvenparameter der gemittelten Sarkomerlängenmessung.

Sarkomerlänge während der Diastole(A): Sarkomerlänge vor der Stimulation; entspricht der Basislinie.

Sarkomerlänge während der Systole (B): Wert der maximalen Auslenkung der Kurve ausgehend von der



	basalen Sarkomerlänge während einer Kontraktion; entspricht der Amplitude bzw. dem Peak.
Amplitudenhöhe (C):	Wert der Amplitudenhöhe in % der Basislinie ausgedrückt; entspricht der relativen Sarkomerlängenverkürzung.
Geschwindigkeit der Kontraktion (D):	Wert der größten Steigung während einer Kontraktionsphase. Da die Kontraktion eine Verkürzung der Sarkomerlänge verursacht, ist dieser Wert immer negativ; je kleiner der Wert, desto größer die Geschwindigkeit.
Zeit bis zur max. Kontraktion (E):	Zeit bis zum Erreichen der maximalen Amplitude (X) während einer Kontraktion, ausgehend von der Stimulation.
Geschwindigkeit der Entspannung (F):	Wert der größten Steigung während einer Entspannungsphase. Da die Entspannung eine Vergrößerung der Sarkomerlänge bedingt, ist dieser Wert immer positiv. Je größer der Wert, desto größer die Geschwindigkeit.
Zeit bis zur 50 % Entspannung (G):	Zeit während der Entspannungs-

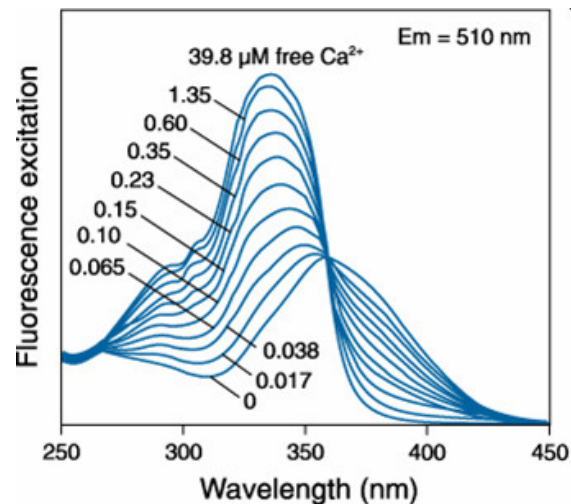


phase bis zum Erreichen von 50 % der maximalen Auslenkung, ausgehend vom Zeitpunkt der größten Kontraktion (X).

#### **2.5.4 Intrazelluläre Kalziumstrommessung mit Fura-2**

Zur simultanen Darstellung der intrazellulären Kalziumströme neben der Sarkomerlängenmessung wurden die Kardiomyozyten mit dem Kalziumchelator Fura-2 beladen. Fura-2 ist spezifisch für Kalziumionen und zeigt gegenüber den anderen Ionen keine oder nur eine geringe Empfindlichkeit. Nach Anregung mit UV-Licht fluoresziert Fura-2 im sichtbaren Bereich. In Abhängigkeit davon, ob Kalzium an Fura-2 gebunden vorliegt oder nicht, verändert sich das Maximum im Anregungsspektrum. Im ungebundenen oder freien Zustand liegt das Maximum des Anregungsspektrums bei 380 nm. Wird hingegen ein Kalziumion gebunden, so lagert es sich in den Hohlraum des Moleküls ein, den die vier Carboxylgruppen bilden. Hierdurch kommt es zur Veränderung im elektronischen Energieniveau des Fura-2-Moleküls und damit zu einem geänderten Absorptionsverhalten. Das Absorptionsmaximum verschiebt sich dabei hin zur kürzeren Anregungswellenlänge von 340 nm. Das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten zwischen der Anregung durch UV-Licht der Wellenlänge 340 nm oder 380 nm, spiegelt somit die intrazelluläre Kalziumkonzentration wieder.

Die Abbildung 2.6 zeigt eine Kalzium induzierte Verschiebung des Anregungsspektrums von 380 hin zu 340 nm, bei gleich bleibendem Emissionsmaximum von 510 nm.



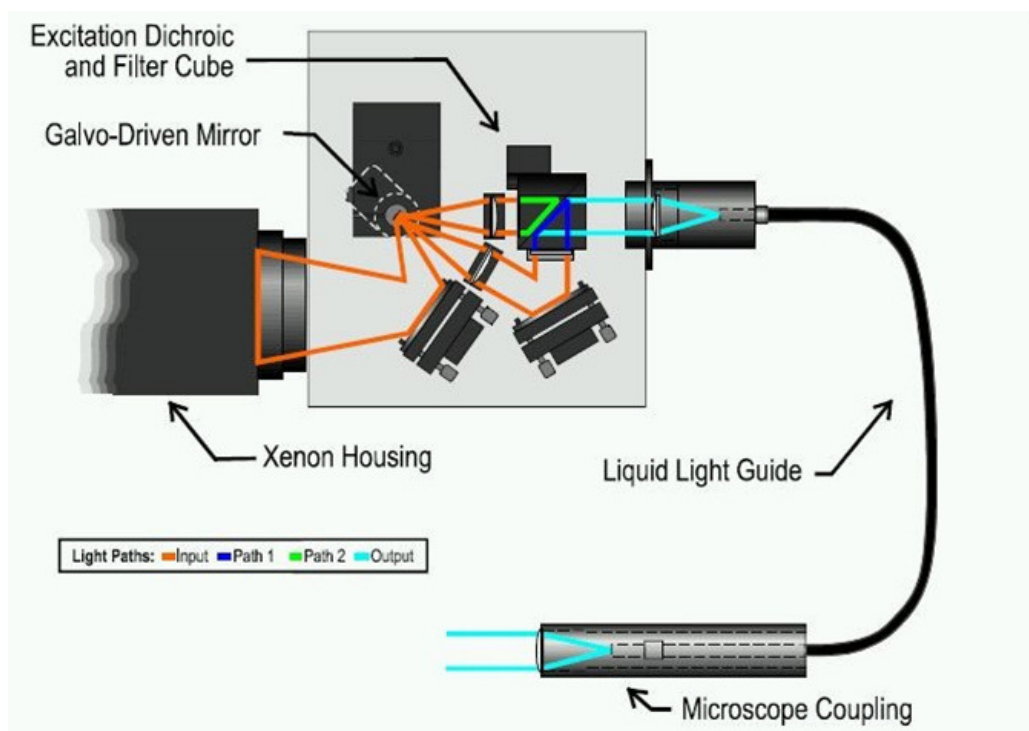
**Abb. 2.7:** Anregungsspektrum von Fura-2 für verschiedene  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentrationen (0-39.8  $\mu\text{M}$ ); Fluoreszenzintensität gemessen bei einem Emissionsspektrum von 510nm für Anregungswellenlängen im Bereich zwischen 250 und 450 nm (Quelle: [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)).

Fura-2 kann auf Grund seiner polaren Struktur als Salz die Zellmembran nicht durchdringen. Daher wurde das membranpermeable Derivat Fura-2-Acetoxy-methyl-(AM)-Ester verwendet. Fura-2 AM besitzt im Gegensatz zu Fura-2 lipophile Gruppen, welche einen leichten Durchtritt durch die Zellmembran ermöglichen. Fura-2 AM kann jedoch keine Verbindung mit Kalziumionen eingehen, solange die lipophilen Gruppen angelagert sind. Intrazellulär vorhandene unspezifische Phosphodiesterasen machte man sich zunutze, um diese lipophilen Gruppen zu entfernen. Das Kalzium spezifische Fura-2 entstand und reicherte sich intrazellulär an.

Fura-2 AM Pulver wurde in DMSO mit der Zielkonzentration 1mM gelöst. Die Inkubation der intakten Kardiomyozyten erfolgte für 30 Minuten mit 1,5  $\mu\text{M}$  Fura-2 AM bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, um extrazelluläre AM Ester zu entfernen. Weitere 20 Minuten Inkubationszeit stellten eine vollständige Entfernung verbliebener lipophiler Gruppen sicher.

Die abwechselnde Anregung durch UV-Licht der Wellenlänge 340 nm oder 380 nm bei hoher zeitlicher Auflösung wurde mit Hilfe des IonOptix *HyperSwitch*

*Dual Excitation Light Source* (IonOptix Corporation, Milton, MA, USA) erreicht. Dieses ermöglichte einen Wellenlängenwechsel in einer Zeit von unter 400  $\mu\text{s}$ . Das Licht einer 75 W Xenonlampe wurde von einem Parabolspiegel zu einem konvergierenden Strahl geformt. Der Strahl wurde dann auf einen galvanometrisch angetriebenen Spiegel fokussiert. Dieser Spiegel lenkte das nun divergierende Licht in einer hohen Geschwindigkeit alternierend zu einer von 2 Sammellinsen (Quarzlinsen), welche das Licht wiederum bündelten.



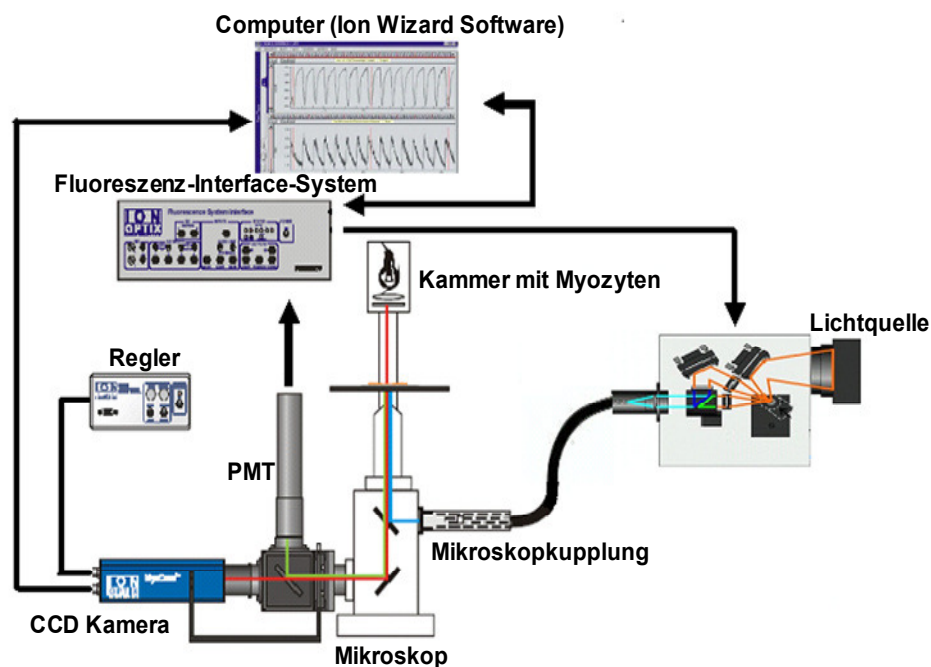
**Abb. 2.8:** IonOptix *HyperSwitch Dual Excitation Light Source* (Quelle: IonOptix Broschüre).

In einem der Pfade (Abb. 2.8 Pfad 2; grün) wurde das Licht direkt nach Durchtritt der Quarzlinse in ein sogenanntes *Excitation Dichroic Cube* (EDC) geleitet. Am Eingang des EDC passierte es einen Emissionsfilter, welcher die jeweilige Wellenlänge des Xenonlichtes bestimmte. Anschließend wurde der Strahl durch den Kaltlichtspiegel in den Ausgang geleitet.

Im anderen Pfad (Pfad 1; blau) wurde das Licht in einem Winkel von 90° in den

Eingang des EDC gelenkt. Zur Bestimmung der Wellenlänge erfolgte wiederum eine Filtration des Strahls. Durch den Kaltlichtspiegels im EDC ließ sich der Strahl in denselben Ausgang reflektieren.

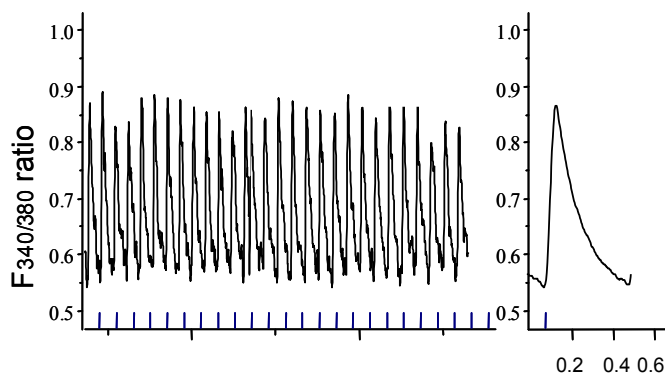
Der Ausgang wurde am Ende eines Flüssiglichtleiters fokussiert. Am anderen Ende dieses Flüssiglichtleiters befand sich eine Mikroskop Kupplung, welche das UV-Licht in die Kammer des mit den Kardiomyozyten bestückten Mikroskops leitete (Abb. 2.8). Das Anregungslicht erreichte die mit Fura-2 beladenen Kardiomyozyten mit 250 Wellenlängenpaaren pro Sekunde, was einer geeigneten zeitlichen Auflösung entsprach, um die intrazellulären Kalziumströme bildlich darzustellen.



**Abb. 2.9:** Aufbauschema des IonOptix Systems zur gleichzeitigen Aufzeichnung von Sarkomerlänge und Kalziumströmen (Quelle: einzelne Grafiken zusammengesetzt aus IonOptix Broschüre).

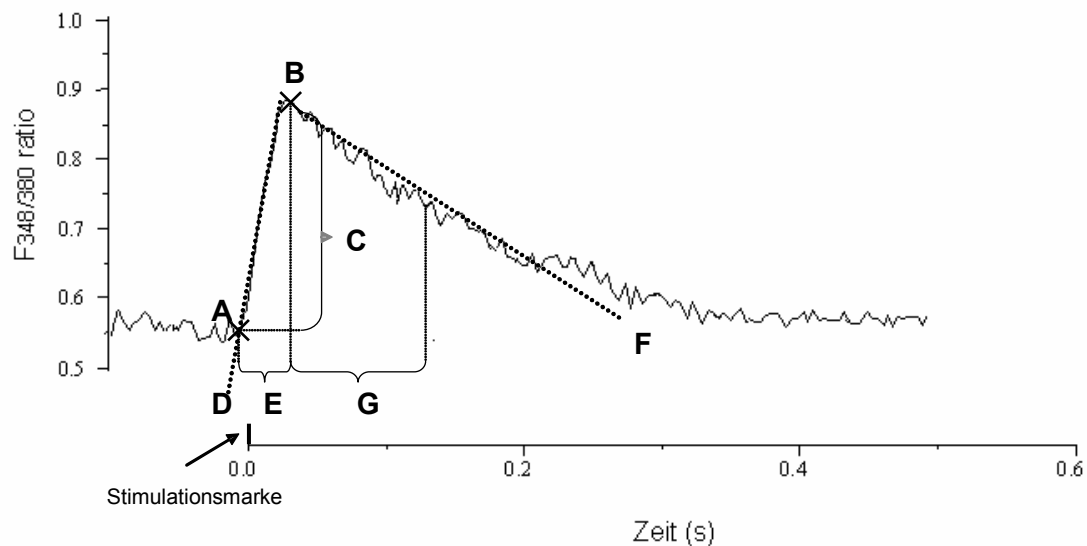
Das von Fura-2 emittierte Licht (grüner Pfad in Abb. 2.9) wurde von einem *Photo Multiplier Tube* (PMT), welcher jedes von einem Kaltlichtspiegel eingeleitete Photon in einen Strom umwandelt, gemessen. Licht von längerer Wellen-

länge (roter Pfad in Abb.2.9) durchquerte den Kaltlichtspiegel und gelangte zur Kamera (MyoCam™, Ion Optix Corporation, Milton, MA, USA). Dadurch wurde die gleichzeitige Messung von Sarkomerlänge und Fluoreszenzintensität ermöglicht. Die IonOptix Software errechnete das Verhältnis zwischen den Fluoreszenzintensitäten bei 340 nm und 380 nm Wellenlänge und stellte diese graphisch als eine Funktion gegen die Zeit dar. Die Stimulationsmarken für die spätere Analyse wurden ebenfalls aufgezeichnet. Die Analyse der Daten der Kalziumströme erfolgte mit Hilfe der IonWizard 5.0 Software. Voraussetzung zur Analyse der Kalziumströme war die Subtraktion der Umfeldhelligkeit. Das Licht der Umgebung beispielsweise im Raum hat einen Einfluss auf das Verhältnis der Kalziumströme. Um eine Vergleichbarkeit der Daten zwischen den verschiedenen Experimentreihen zu gewährleisten, wurde die Hintergrundbeleuchtung während des Versuchs für jede einzelne Zelle erfasst und jeweils subtrahiert. Die folgenden Analyseschritte erfolgten in ähnlicher Weise wie die der Sarkomerlänge. Es wurden 20-30 einzelne Kalziumströme gemittelt (Abb. 2.10). Aus der gemittelten Kurve errechnete das Programm verschiedene Kurvenparameter (Abb. 2.10).



**Abb. 2.10:** Repräsentative Aufnahme einzelner Kalziumtransienten (links) und gemittelte Kalziumstromkurve aus den 20-30 einzelnen Kalziumtransienten (rechts).

### 2.5.5 Zusammenstellung der Kurvenparameter der Kalziumstrommessung



**Abb. 2.11:** Kurvenparameter der gemittelten Kalziumstrommessung.

Diastolische Kalziumkonzentration (A):	Wert des Fluoreszenzverhältnis vor der Stimulation; entspricht der Basislinie.
Systolische Kalziumkonzentration (B):	Wert der maximalen Auslenkung der Kurve, ausgehend von der Basislinie während einer Kontraktion; entspricht der Amplitude.
Amplitudenhöhe (C):	Wert der Amplitudenhöhe in % der Basislinie ausgedrückt.
Geschwindigkeit des Kalziumanstiegs (D):	Wert der größten Steigung während einer Kontraktionsphase. Da der Kontraktion des Herz-

muskels eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration vorausgeht, ist dieser Wert immer positiv; Je größer der Wert desto größer die Geschwindigkeit.

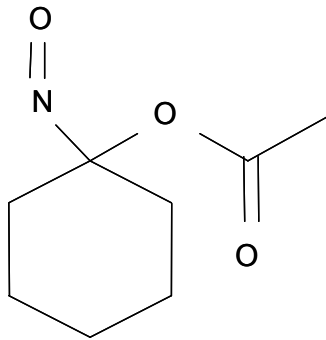
Zeit bis zur max. Kalziumkonzentration (E): Zeit bis zum Erreichen der maximalen Amplitude (X) während einer Kontraktion des Herzmuskels, ausgehend von der Stimulation.

Geschwindigkeit des Kalzium-Rückflusses (F): Wert der kleinsten Steigung während einer Entspannungsphase. Da der Entspannung des Herzmuskels eine Erniedrigung der Kalziumkonzentration vorausgeht, ist dieser Wert immer negativ. Je kleiner, desto größer die Geschwindigkeit.

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

## 2.6 1-Nitrosocyclohexyl Acetat als HNO-Donator

Aufgrund der Metastabilität von Nitroxyl (HNO) wurde in den Versuchen auf Donatoren zurückgegriffen, welche die Möglichkeit besitzen HNO freizusetzen. *Acycloxy-Nitroso-Compounds* darunter 1-Nitrosocyclohexyl Acetat (NCA) sind neue HNO-Donatoren, die von Bruce King hergestellt werden. NCA setzt mittels Hydrolyse neben HNO auch Ketone und Essigsäure frei. Die Freisetzung von HNO erfolgt bei einem physiologischen pH Wert von 4-8. Die Abgaberate hängt dabei 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 (Sha et al. 2006).



**Abb. 2.12:** Strukturformel von 1-Nitrosocyclohexyl Acetat (Quelle: Sha et al.).

Bei Raumtemperatur liegt NCA als tiefblaue Lösung vor. Die tiefblaue Farbe und der stechende Geruch sind wichtige Indikatoren für die Unversehrtheit des Donators. NCA ist lichtempfindlich und muss bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert werden. Der Donator ist in DMSO gelöst, stabil. Die Aliquotierung und Aufbewahrung von NCA erfolgte daher in DMSO, damit die Stammlösung durch wiederholtes Auftauen und Einfrieren keine Qualitätsverluste erfahren würde. Dazu wurden  $5\text{ }\mu\text{l}$  NCA (MW 171,19 g/mol) in  $20\text{ }\mu\text{l}$  DMSO zu einer 2 M Lösung gelöst und bis zum Versuch bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Vor Beginn des Versuches wurden weitere Verdünnungen vorgenommen, um die gewünschte Konzentration während des Versuchs erreichen zu können. Während des gesamten Versuches wurde der Donator auf Eis gelagert und vor Licht geschützt.



## 2.7 Statistische Auswertungen

Alle angegebenen Daten repräsentieren Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des arithmetischen Mittelwertes (SEM). Mit n wurde die Anzahl der Zellen bzw. Tiere bezeichnet. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe der GraphPad Software 5.0 durchgeführt. Die Signifikanz wurde mit dem Student t-Test für gepaarte und ungepaarte Werte nachgewiesen, wenn zwei Gruppen miteinander verglichen wurden. Zum Vergleich mehrerer Gruppen wurde ein ANOVA-Test durchgeführt. Ein P Wert von kleiner 0.05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

## 2.8 Liste der Chemikalien

Substanzname	Warnhinweise (R- und S-Sätze)	Hersteller
Angeli's Salz		Cayman Chemical Company
Aqua ad injectabilia		Baxter GmbH
2,3-Butandionmonoxim (BDM)	S: 22-24/25	Sigma-Aldrich
Kalziumchlorid Dihydrat (CaCl <sub>2</sub> × 2 H <sub>2</sub> O)		Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	R: 36/37/38 S: 23-26-36	Merck
Dobutamin	R: 20/21/22-63 S: 22-26-36/37/39	Carinopharm GmbH
Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA)	R: 36/37/38 S: 26	Merck
Ethanol (96%)	R: 11 S: 7-16	Geyer
Ethylenglycol bis (2-aminoethylether)-N,N,N',N'		Merck
Fetal calf serum (FCS)		Invitrogen
Fura-2 AM		Invitrogen
D-(+)-Glukose Monohydrat		Merck
4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin-ethanschwefelsäure (HEPES)		Roth
Salzsäure (37%)	R: 34-37	Merck

<b>Substanzname</b>	<b>Warnhinweise (R- und S-Sätze)</b>	<b>Hersteller</b>
	S: 26-36/37/39-45	
Isoprenalin Hydrochlorid	R: 36/37/38 S: 26-36	Sigma-Aldrich
Liberase Blendzyme 3	R: 36/37/38-42/43 S: 22-24/25	Roche Diagnostics
Magnesiumsulfat Heptahydrat (MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O)		Merck
Methanol	R: 11-23/24/25- 39/23/24/25 S: 7-16-36/37-45	Merck
1-Nitrosocyclohexyl Acetat (NCA)		King Laboratories
Kaliumchlorid (KCl)	S: 22-24/25	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )		Merck
Kaliumhydrogenkarbonat (KHCO <sub>3</sub> )		Merck
Koffein	R:20, S: 2	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid (NaCl)		J.T. Baker
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )		Merck
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O)	S: 22-24/25	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	R: 35 S: 26-37/39-45	Merck
Taurin	R: 36/37/38 S: 26-36	Merck

## 2.9 Liste der Verbrauchsmaterialien

<b>Materialien</b>	<b>Hersteller</b>
Deckgläser 24 x 60 mm	Marienfeld
Falcon Röhrchen 15 ml, 50 ml	Sarstedt
Einwegkanülen	B. Braun
Einwegspritzen, Injekt 10 ml, 20 ml	B. Braun
Insulinspritzen	Becton Dickinson
Küvetten	Sarstedt

<b>Materialien</b>	<b>Hersteller</b>
Petrischalen 10 mm	Sarstedt
Pinzetten	Fine Science Tools
Pipetten (serologisch) 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Sarstedt
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2ml	Eppendorf
Sterilfilter 45µM	Qualilab
Vakuumfilter 250 ml,500 ml	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Sarstedt

## 2.10 Liste der Laborgeräte

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
Analytikwaage	Sartorius AG
Arc lamp power supply	Cairn Research
Axivert 25 Inversmikroskop	Zeiss
Brutschrank	Hereaus
Fluorescence System Interface	IonOptix Corporation
Fotometer, Smart Spec™ 3000	Bio-Rad
HyperSwitch high intensity arc lamp	IonOptix Corporation
Kühlzentrifuge 5415 R	Eppendorf
Kühlzentrifuge Universal 30 RF	Hettich
Magnetrührer COMBIMAG RET	Janke & Kunkel
Milli-Q Plus Reinstwasseranlage	Millipore
MyoCam	IonOptix Corporation
MyoPacer field simulator	IonOptix Corporation
Nikon Eclipse TS 100 inverse microscope	Nikon
Perfusionssystem	Eigenproduktion
Peristaltische Pumpe	Pharmacia
pH-Meter	Knick GmbH
Pipetten Reference, 10 µL, 100 µL, 1000 µL	Eppendorf
Pipettierhilfe accu jet	Brand
Präzisionswaage CP225D	Sartorius
Pumpensystem P680	Dionex Corporation

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
Stimulation/Thermistor assay	CellMicroControls
Stimulationszelle für Myozyten	CellMicroControls
Stimulationzellenhalterung	CellMicroControls
Thermostat	CellMicroControls
Videopower	IonOptix Corporation
Vortex Reax 200	Heidolph
Wasserbad	GFL
Wasserbad Thermostat	Eppendorf

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Hypertrophie induziert durch chronische $\beta$ -adrenerge Stimulation**

Daten aus der Literatur zeigen, dass eine chronische  $\beta$ -adrenerge Stimulation zu einem pathologischen Hypertrophie-Modell mit verstärkter kardialer Dysfunktion führt (El-Armouche und Eschenhagen 2008, Wittkoepper et al. 2010).

Im Folgenden soll die Frage beantwortet werden: Welchen Effekt zeigt das freigesetzte HNO vom neu synthetisierten Donator NCA auf dieses kardio-vaskuläre Stressmodell? Zur chronischen  $\beta$ -adrenergen Stimulation wurde gleichaltrigen und gleichgeschlechtlichen Mäusen über einen Zeitraum von 5 Tagen Isoprenalin mittels osmotischen Pumpen appliziert (30mg/kg\*Tag). Die Kontrolltiere erhielten osmotische Pumpen mit 0,9% NaCl. Der Verlauf wurde an Tag 0 und Tag 5 echokardiographisch festgehalten. Im Anschluss an die echokardiographischen Messungen an Tag 5 erfolgte die Herzentnahme.

##### **3.1.1 Echokardiographische Untersuchungen vor und nach chronischer $\beta$ -adrenerger Stimulation**

Zur Untersuchung der Herzfunktion am lebenden Tier wurde eine Echokardiographie durchgeführt. Die echokardiographische Analyse vor der Isoprenalin-Infusion an Tag 0 zeigte sowohl für Kontrolltiere (NaCl-Gruppe) als auch für die Tiere mit Behandlung (Iso-Gruppe) keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich des Körpergewichts (BW), der linksventrikulären Masse (LVM), der linksventrikulären Masse durch Körpergewicht (LVW/BW) und der linksventrikulären Flächenverkürzungsfraction (FAS). Der Prozentsatz der linksventrikulären Flächenverkürzungsfraction (FAS) wurde als Maß für die Kontraktilität des Myokards verwendet. Da die Analyse der Parameter keine Unterschiede ergab, deutete das auf vergleichbare Ausgangsbedingungen zwischen den Tieren der NaCl- und der Iso-Gruppe hin. Es zeigten sich somit keine Auffälligkeiten in der Herzmorphologie der Tiere beider Gruppen an Tag 0.

Um den Erfolg der fünftägigen  $\beta$ -adrenergen Stimulation mit Isoprenalin zu überprüfen, wurden am 5. Tag erneut echokardiographische Untersuchungen vorgenommen. Die graphische Darstellung der LVM als Maß der Hypertrophieentwicklung an Tag 5 ergab für die Tiere mit der NaCl-Infusion keinen signifikanten Unterschied zum Tag 0. Die chronische Isoprenalin-Infusion in den Tieren führte jedoch zu einer Zunahme der LVM um 29%. Das Körpergewicht der Versuchstiere aus der NaCl-Gruppe zeigte ebenfalls keinen Unterschied zwischen Tag 0 und Tag 5, bei der Iso-Gruppe hingegen kam es zu einem Anstieg von 8%. Der Quotient aus LVM und BW erhöhte sich in der Iso-Gruppe um 22%. Es kam an Tag 5 zu keiner Veränderung der Kontraktilität (FAS) in beiden Gruppen gegenüber den basalen Bedingungen an Tag 0.

**Tabelle 3.1:** Echokardiographieergebnisse

	NaCl-Gruppe (n=11)		ISO-Gruppe (n=11)	
	Tag0	Tag5	Tag0	Tag5
LVM (mg)	83.6±4.4	84.7±2.7	87.5±3.7	112.7±4.8*
BW (g)	26.8±1.4	27.5±1.2	26.4±0.9	28.6±0.9 <sup>#</sup>
LVM/BW (mg/g)	3.1±0.1	3.2±0.1	3.3±0.1	4.0±0.2*
FAS (%)	49.1±2.5	47.2±1.5	47.4±1.8	48.4±2.4

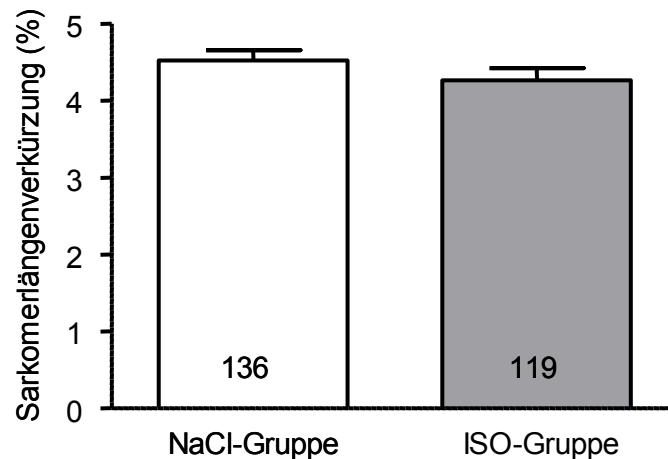
Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  vs. alle; <sup>#</sup> $p < 0.05$  vs. ISO-Gruppe Tag 0. Mit n wurde die Anzahl der Tiere bezeichnet.

Die Daten zeigen zusammenfassend, dass die chronische Isoprenalin-Infusion eine Herzhypertrophie induziert hat, aber keinen Einfluss auf die Kontraktilität des Herzens zeigt.

### 3.1.2 Sarkomerlängenmessung *in vitro* nach chronischer $\beta$ -adrenerger Stimulation

Nach Isolation der Kardiomyozyten wurde zunächst die basale Sarkomerlängenverkürzung vom IonOptix Gerät erfasst. Die basale Sarkomerlängenverkürzung entspricht der Kontraktilität der jeweiligen Zelle, die nach elek-

trischer Stimulation mit 1 Hz und 15 V ohne Zusatz von Substanzen gemessen wurde. Die Kardiomyozyten aus der Kontrollgruppe wiesen eine basale Sarkomerlängenverkürzung von  $4,5 \pm 0,1\%$  auf. Die Kardiomyozyten aus der Gruppe mit chronischer Isoprenalin-Behandlung zeigten eine basale Sarkomerlängenverkürzung von  $4,3 \pm 0,2\%$ . Vergleichbar mit den unveränderten linksventrikulären Flächenverkürzungsfractionen (FAS%, Tabelle Nr.1) der echokardiographischen Daten *in vivo* zeigte auch die basale Sarkomerlängenverkürzung an den isolierten Kardiomyozyten *in vitro* zwischen beiden Gruppen keinen signifikanten Unterschied.

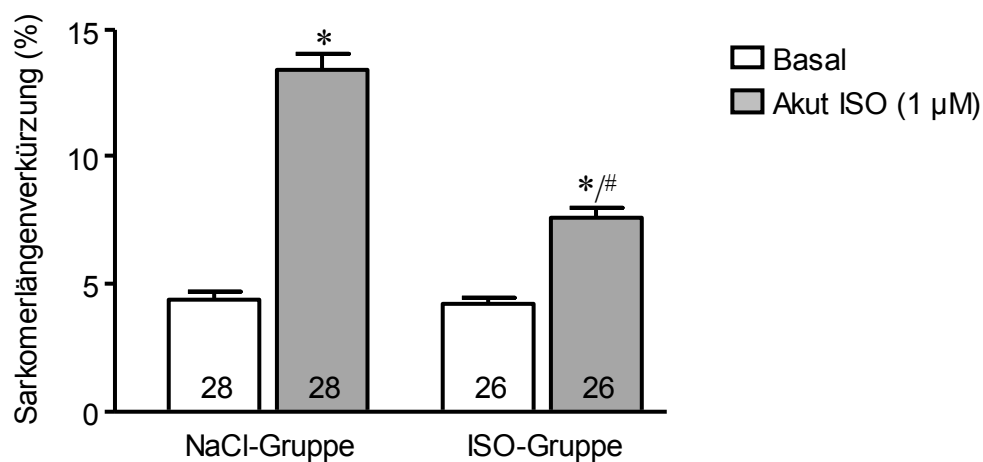


**Abb. 3.1:** Kein Unterschied der relativen Sarkomerlängenverkürzung von stimulierten Kardiomyozyten (1 Hz/15 V) isoliert aus der Kontrollgruppe oder der Gruppe mit chronischer Isoprenalin-Behandlung unter basalen Bedingungen. Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM. Nicht signifikant;  $p > 0,05$  vs. NaCl-Gruppe; Student's *t*-test. Die Anzahl der Zellen ist in den Säulen angegeben.

### 3.2 Wirkung von Isoprenalin auf die Sarkomerlänge von Kardiomyozyten nach chronischer $\beta$ -adrenerger Stimulation

In den folgenden Experimenten wurde die Reaktion auf eine maximale Isoprenalinkonzentration bei normalen Kardiomyozyten gegenüber chronisch  $\beta$ -adrenerg stimulierten Zellen untersucht. Dazu wurde elektrisch stimulierten (1 Hz/15 V) Kardiomyozyten  $1 \mu\text{M}$  Isoprenalin appliziert und die Veränderung der

Kontraktilität, gemessen als Veränderung der Sarkomerlängenverkürzung, aufgezeichnet. Die Sarkomerlängenverkürzung war unter basalen Bedingungen sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Isoprenalin behandelten Gruppe ähnlich, stieg jedoch nach akuter Isoprenalin-Applikation in beiden Gruppen unterschiedlich stark an. Unter Einfluss von 1  $\mu\text{M}$  Isoprenalin kam es in der Kontrollgruppe zu einer absoluten Steigerung der Kontraktilität um 9,04% und in der chronisch behandelten Gruppe lediglich zu einer Steigerung um 3,35% gegenüber dem Ausgangsstadium. Somit war die Sarkomerlängenverkürzung nach akuter Isoprenalin-Gabe in der Gruppe der chronisch  $\beta$ -adrenerg behandelten Kardiomyozyten gegenüber den Kontrollzellen um 63% vermindert. Die geringere Antwort der chronisch  $\beta$ -adrenerg stimulierten Zellen auf Isoprenalin weist darauf hin, dass eine  $\beta$ -adrenerge Desensibilisierung stattgefunden hat.



**Abb. 3.2:** Akuter Effekt von Isoprenalin (ISO, 1  $\mu\text{M}$ ) auf die relative Verkürzung der Sarkomere von stimulierten (1 Hz/15 V) Kardiomyozyten der NaCl- oder Isoprenalin behandelten Gruppe. Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  vs. basal; # $p < 0.05$  vs. 1  $\mu\text{M}$  ISO-behandelte NaCl-Gruppe; Student's *t*-test. Die Anzahl der Zellen ist in den Säulen angegeben.

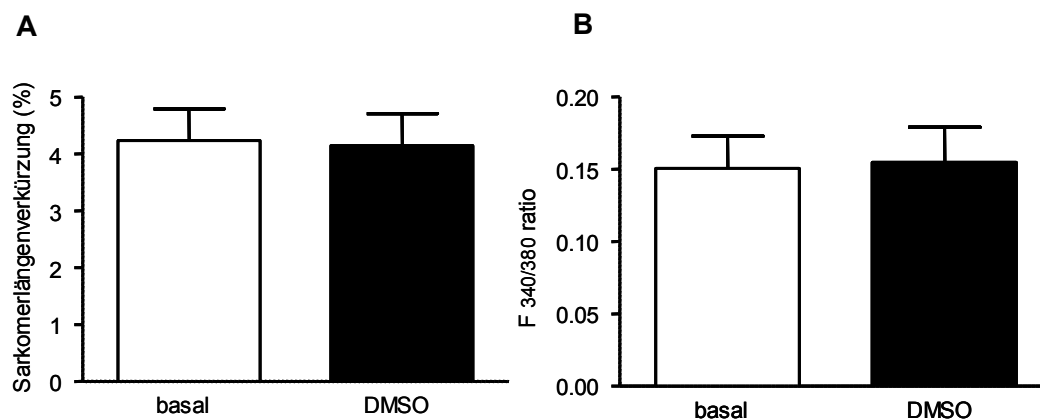


### 3.3 Wirkung von NCA auf die Sarkomerlänge von Kardiomyozyten nach chronischer $\beta$ -adrenerger Stimulation

#### 3.3.1 Kontrolleexperimente

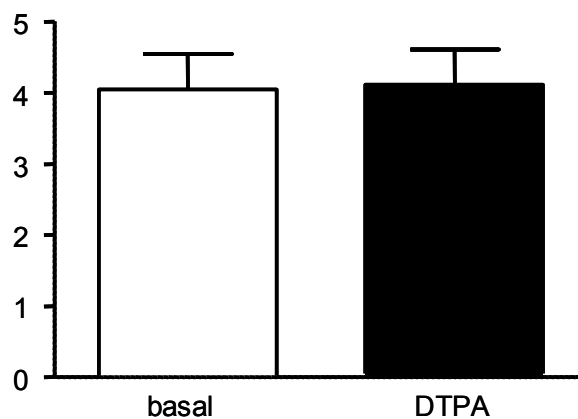
Um die Wirkungen von HNO überprüfen zu können, wurde der HNO-Donator NCA verwendet. NCA ist in DMSO gelöst stabil und setzt kein HNO frei, deshalb wurden Aliquots aus NCA und DMSO hergestellt und verwendet. Diese wurden dann mehrfach in dem für den Versuch verwendeten Phosphatpuffer verdünnt, um die gewünschten Konzentration von NCA während des Versuchs erreichen zu können. In den Versuchsreihen wurde deshalb neben dem NCA auch eine geringe Menge DMSO appliziert. Um einen möglichen Effekt von DMSO auf die Kardiomyozyten *in vitro* ausschließen zu können, wurden Kontrolleexperimente mit DMSO durchgeführt.

Dazu wurde die höchst eingesetzte DMSO-Konzentration getestet, die bei 0,006% lag. Es konnte kein Einfluss von DMSO auf die Sarkomerlängenverkürzung und die Kalziumtransienten festgestellt werden (Abb. 3.3).



**Abb. 3.3:** Keine Veränderung der relativen Sarkomerlängenverkürzung (A) und der maximalen Amplitude des Kalziumtransienten (B) von stimulierten (1 Hz/15 V) Kontrollzellen unter Einfluss von 0,006% DMSO. Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben. Nicht signifikant;  $p > 0,05$  vs. basal; Student's *t*-test.

Mit dem Ziel eine potenzielle Konversion von HNO zu NO zu verhindern wurde in allen Versuchen, in denen es zum Einsatz von HNO-Donatoren kam, jeweils eine Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  des Metallchelators DTPA in die Messkammer mit den Kardiomyozyten appliziert (Irvine et al. 2003). Es wurden Kontrollexperimente durchgeführt, um mögliche Wirkungen des DTPA auf die Kardiomyozyten zu überprüfen. Wie in der Abbildung 3.4 ersichtlich konnte unter Einfluss von 50  $\mu\text{M}$  DTPA kein signifikanter Unterschied der Sarkomerlängenverkürzung festgestellt werden.

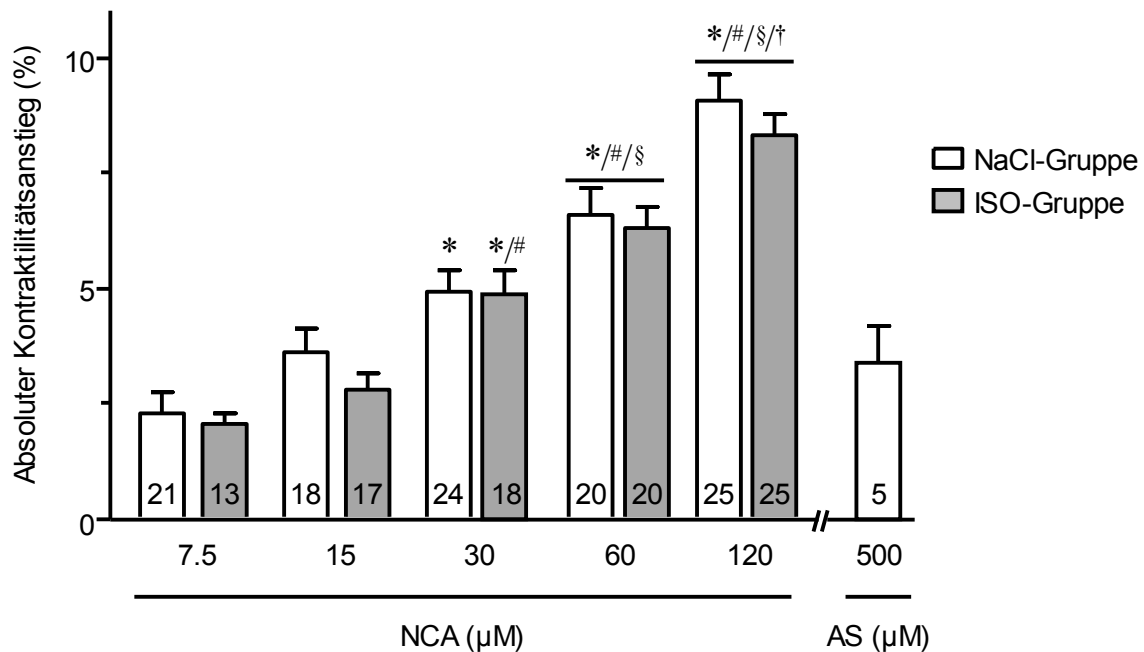


**Abb. 3.4:** Keine Veränderung der relativen Sarkomerlängenverkürzung von stimulierten (1 Hz/15 V) Kontrollzellen unter Einfluss von 50  $\mu\text{M}$  DTPA. Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben. Nicht signifikant;  $p > 0,05$  vs. basal; Student's *t*-test.

### 3.3.2 Herstellung einer Konzentrations-Wirkungs-Beziehung

Im Folgenden galt es zu untersuchen, welchen Effekt NCA auf die  $\beta$ -adrenerg desensibilisierten, hypertrophierten Kardiomyozyten hat. Der positiv inotrope Effekt von NCA auf normale Kardiomyozyten aus ventrikulärem Herzgewebe ist in unserer Arbeitsgruppe bereits erforscht wurden, jedoch war bisher nicht bekannt welchen Effekt NCA auf pathologisch veränderte Kardiomyozyten hat. Um dieser Frage nachzugehen wurden verschiedene Konzentrationen von NCA untersucht und eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve erstellt. Begonnen wurde mit der Konzentration 7,5  $\mu\text{M}$ , da diese Konzentration erstmals einen Effekt auf normale Zellen zeigte. Anschließend wurde die Konzentration jeweils verdoppelt

bis hin zu einem maximal tolerierbaren Effekt von NCA.



**Abb. 3.5:** Einfluss der steigenden NCA-Konzentrationen und Angeli's Salz (AS) auf die absolute Kontraktilität von stimulierten (1 Hz/15 V) Kardiomyozyten isoliert aus der NaCl- oder der chronisch  $\beta$ -adrenerg behandelten Gruppe. Der absolute Kontraktilitätsanstieg wurde berechnet aus der Differenz des Anstiegs der Sarkomerlängenverkürzung unter NCA bzw. AS Einfluss und der basalen Sarkomerlängenverkürzung. Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben. Die Anzahl der Zellen, jeweils isoliert aus 3-7 Mäusen, ist in den Säulen angezeigt. Jedes \* $p < 0.05$  vs. 7.5  $\mu$ M NCA; # $p < 0.05$  vs. 15  $\mu$ M NCA; § $p < 0.05$  vs. 30  $\mu$ M NCA; † $p < 0.05$  vs. 60  $\mu$ M NCA.

Die Abbildung 3.5 zeigt den absoluten Kontraktilitätsanstieg (gemessen aus der Differenz des Anstiegs der Kontraktilität unter NCA Einfluss und der basalen Kontraktilität) der isolierten Kardiomyozyten bei Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von NCA in der Kontrollgruppe und in der Gruppe mit chronischer Isoprenalin-Behandlung. In der Kontrollgruppe nahm die Kontraktilität mit zunehmender Konzentration von NCA zu (+ 54% gegenüber basal bei 7,5  $\mu$ M NCA, + 90% gegenüber basal bei 15  $\mu$ M NCA, + 126% gegenüber basal bei 30  $\mu$ M, + 182% gegenüber basal bei 60  $\mu$ M, + 200% gegenüber basal bei 120  $\mu$ M). In der Gruppe mit chronischer Isoprenalin-Behandlung stieg die Kontraktilität

ebenfalls mit steigender NCA- Konzentration an (+ 42% gegenüber basal bei 7,5  $\mu\text{M}$  NCA, + 89% gegenüber basal bei 15  $\mu\text{M}$ , + 108% gegenüber basal bei 30  $\mu\text{M}$ , + 170% gegenüber basal bei 60  $\mu\text{M}$ , + 190% gegenüber basal bei 120  $\mu\text{M}$ ), ohne dass sich die Effekte bei der jeweiligen NCA-Konzentration von den Effekten in der Kontrollgruppe signifikant unterschieden. Aus den Experimenten lässt sich ableiten, dass der  $\text{EC}_{50}$  bei ungefähr 55  $\mu\text{M}$  liegt.

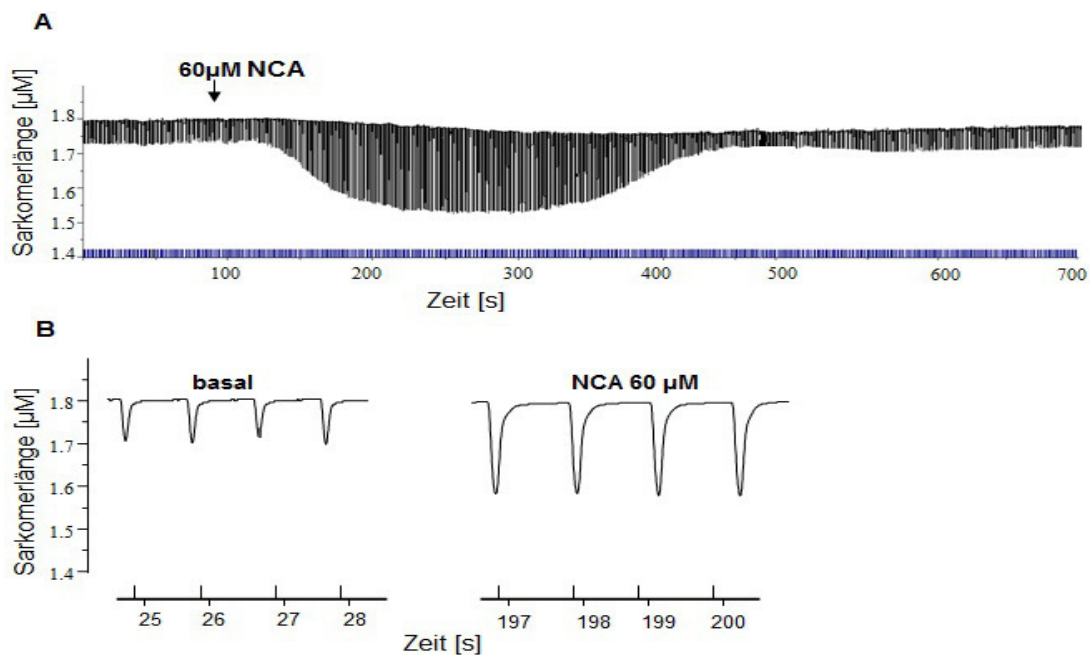
Interessanterweise erreichte der positiv inotrope Effekt von 120  $\mu\text{M}$  NCA auf chronisch  $\beta$ -adrenerg stimulierten Kardiomyozyten den Maximaleffekt der akuten Isoprenalin-Gabe auf die Kontrollkardiomyozyten (Abb. 3.2). Die Steigerung der Kontraktilität von Kardiomyozyten mit chronischer Isoprenalin-Behandlung bei Applikation von 120  $\mu\text{M}$  NCA betrug 8,9%, wobei der Kontraktilitätsanstieg der Kardiomyozyten aus der Kontrollgruppe nach akuter 1  $\mu\text{M}$  Isoprenalin-Applikation ebenfalls 8,9% betrug. Darüber hinaus war die positiv inotrope Wirkung einer 60  $\mu\text{M}$  NCA Konzentration auf chronisch  $\beta$ -adrenerg behandelte Kardiomyozyten signifikant gegenüber des Maximaleffektes der akuten Isoprenalin-Gabe auf  $\beta$ -adrenerg behandelten Kardiomyozyten erhöht (um 59%).

Um eine Vergleichbarkeit der Wirkung des neuen HNO-Donators NCA mit dem in der Literatur bisher am besten erforschten HNO-Donators *Angeli's Salz* (AS) herzustellen, wurden Kardiomyozyten aus gesunden Herzen (C57/Bl/6J) nach gleichem Präparationsprotokoll isoliert (siehe 2.4). Dabei wurde die Sarkomerlängenverkürzung bei einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  untersucht, die häufig in der Literatur für *in vitro* Versuche verwendet wurde (Tocchetti et al. 2007). 500 $\mu\text{M}$  AS führte zu einer Steigerung der relativen Kontraktilität der Kardiomyozyten gegenüber basal um 86% vergleichbar mit den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen (Tocchetti et al. 2007). Der absolute Anstieg der Kontraktilität von 3,4% unter dem Einfluss von 500  $\mu\text{M}$  AS entsprach dem absoluten Anstieg der Kontraktilität von NCA bei einer Konzentration von 15  $\mu\text{M}$ .

### 3.3.3 Messkurven unter Einfluss von NCA

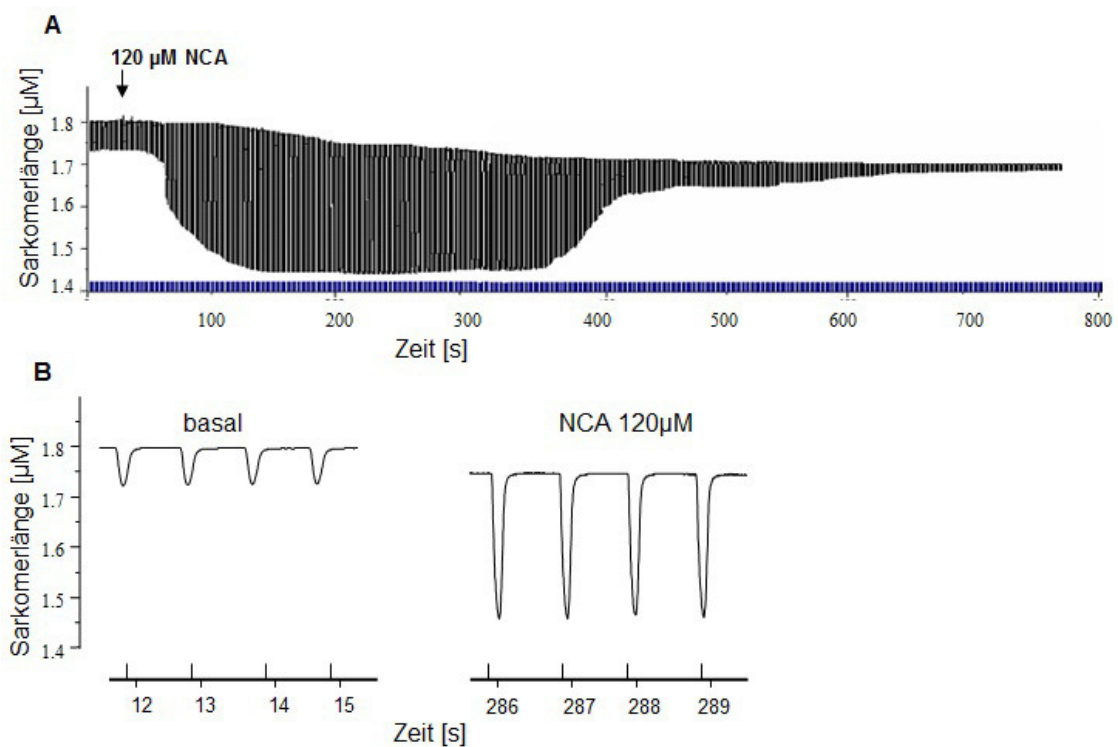
Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve (Abb. 3.5) von NCA wurde bis zum erstmaligen Auftreten eines maximal tolerierbaren Effekts nach Hinzugabe von NCA auf die einzelnen Kardiomyozyten erstellt. Dieser lag bei einer Konzentration von 120  $\mu\text{M}$  NCA. Zur Veranschaulichung der Wirkung von NCA auf die Kardiomyozyten dienen die beiden unten dargestellten repräsentativen Messkurven. Von jeder elektrisch stimulierten Herzmuskelzelle (1 Hz/15 V) wurde zunächst einmal die basale Kontraktilität gemessen bevor der HNO-Donator NCA hinzugegeben wurde. Die Messungen erfolgten nur an Herzmuskelzellen mit einer diastolischen Sarkomerlänge zwischen 1,75 -1,8  $\mu\text{m}$ . Die Sarkomerlänge zwischen 1,75 -1,8  $\mu\text{m}$  ist ein wichtiges Auswahlkriterium, denn sie ist ein Hinweis für die Unversehrtheit der Zellen und folglich für die Qualität der Daten.

In der Abbildung 3.6 ist die Messkurve einer Sarkomerlängenmessung unter dem Einfluss von 60  $\mu\text{M}$  NCA dargestellt. Diese zeigt exemplarisch den generellen Ablauf der HNO-bedingten positiven Inotropie. Nach NCA Gabe kam es zum einem graduellen Anstieg der Kontraktilität bis zum Erreichen eines Plateaus. Nach einiger Zeit schwächte der Effekt wieder ab und kehrte zurück auf die basale Kontraktilität. Der HNO- Effekt ist somit reversibel.



**Abb. 3.6:** (A) Messkurve der Sarkomerlängenmessung einer stimulierten Kardiomyozyte (1 Hz/ 15 V) unter Einfluss von 60  $\mu\text{M}$  (Screenshot SarcLen Acquisition Software); (B) Vergrößert dargestellte einzelne Sarkomerlängenverkürzungen vor und nach Zugabe von 60  $\mu\text{M}$  NCA.

Die Abbildung 3.7 zeigt hingegen die Messkurve einer Sarkomerlängenmessung unter Einfluss von 120  $\mu\text{M}$  NCA. Hier kommt es nach Zugabe von NCA zu einem stärkeren Anstieg der Kontraktilität gefolgt von einem Plateau. Gleichzeitig sank die diastolische Sarkomerlänge, was einer verminderten Fähigkeit zur Relaxation entsprach. Die Kontraktilität schwächte ebenfalls wieder ab und erreichte die Ausgangsbedingung, fiel dann jedoch auf ein niedrigeres Kontraktionsniveau ab. Der HNO-Effekt war ebenfalls reversibel.

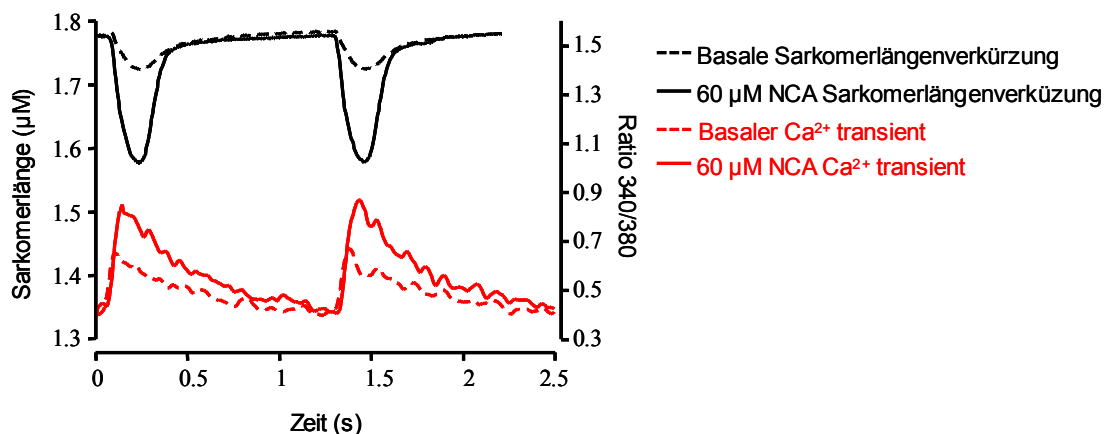


**Abb. 3.7:** (A) Messkurve der Sarkomerlängenmessung einer stimulierten Kardiomyozyte (1 Hz/ 15 V) unter Einfluss von 120  $\mu\text{M}$  (Screenshot SarcLen Acquisition Software); (B) Vergrößert dargestellte einzelne Sarkomerlängenverkürzungen vor und nach Zugabe von 120  $\mu\text{M}$  NCA.

### 3.4 Wirkung von NCA auf die intrazelluläre Kalziumionen-zirkulation nach chronischer $\beta$ -adrenerger Stimulation

#### 3.4.1. Simultane Sarkomerlängen- und Kalziumstrommessung

Um die Auswirkungen von NCA auf die intrazellulären Kalziumströme zu erforschen, wurden isolierte ventrikuläre Kardiomyozyten mit dem fluoreszierenden Farbstoff Fura-2 beladen. Die Kalziumstrommessung erfolgte simultan zu der Sarkomerlängenmessung bei einer extrazellulären Kalziumkonzentration von 1,25 mM und einer elektrischen Stimulationsfrequenz von 1 Hz bei einer Spannung von 15 V. Die repräsentative Aufnahme 3.8 stellt ein Beispiel für die gleichzeitige Messung der Sarkomerlänge und der Kalziumtransienten unter dem Einfluss von 60  $\mu$ M NCA dar. Nach Zugabe von NCA verschob sich die Kurve der Kalziumströme nach oben. Dies entsprach einer erhöhten basalen Kalziumionenkonzentration im Zytoplasma. Die Erhöhung der Kalziumzirkulation ging mit einer Erhöhung der Kontraktilität einher.



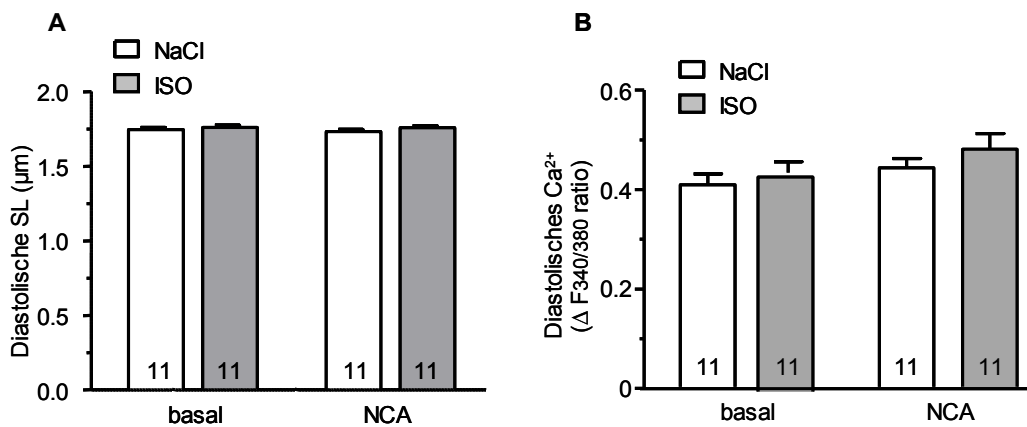
**Abb. 3.8:** Zeitliche Relation der Sarkomerlänge und des Kalziumtransienten unter Einfluss von 60  $\mu$ M NCA.

#### 3.4.2 Veränderung der Kurvenparameter unter Einfluss von 60 $\mu$ M NCA

Von jeder Zelle wurden zunächst die basale Sarkomerlängenverkürzung und der basale Kalziumtransient gemessen. Nach NCA Applikation wurden beide

Messwerte erneut erfasst. Die Veränderung der Kurvenparameter der Sarkomerlängen- und der Kalziumstrommessung unter dem Einfluss von 60  $\mu\text{M}$  NCA (in der Nähe des  $\text{EC}_{50} \sim 55 \mu\text{M}$ ) im Vergleich zu den Ausgangsbedingungen ist in den Abbildungen 3.8 bis 3.11 zusammengefasst.

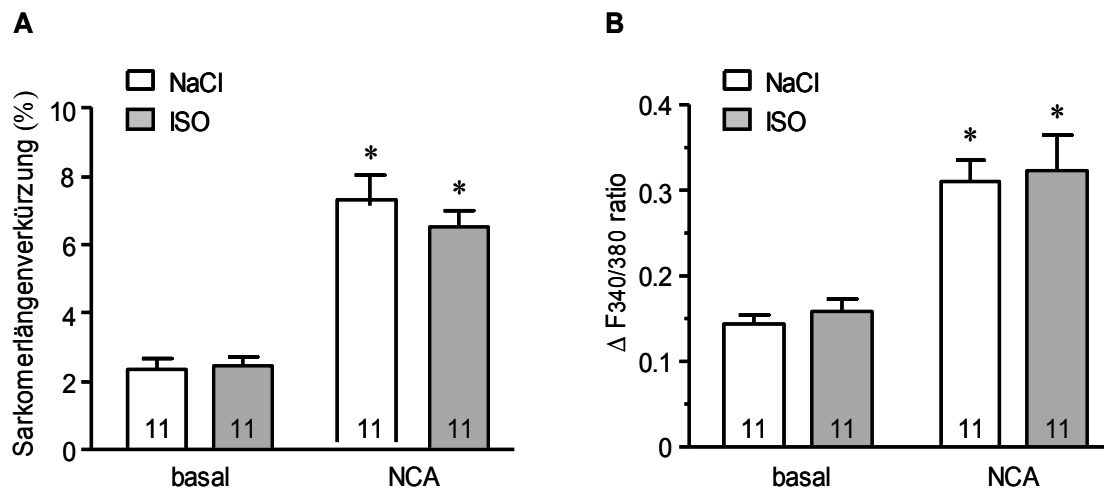
Die diastolische Sarkomerlänge unter basalen Bedingungen lag in der Gruppe mit chronischer Isoprenalin-Behandlung (Iso-Gruppe) bei  $1,76 \pm 0,01$  und in der Kontrollgruppe (NaCl-Gruppe) bei  $1,75 \pm 0,01$  (Abb. 3.9, A). In beiden Gruppen gab es somit keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der diastolischen Sarkomerlänge. Auch unter dem Einfluss von NCA kam es zu keiner Veränderung der diastolischen Sarkomerlänge ( $1,73 \pm 0,02$  vs.  $1,76 \pm 0,01$ ). Die diastolische Kalziumkonzentration (Abb. 3.9, B) war basal sowohl in der NaCl-Gruppe als auch in der Iso-Gruppe ähnlich ( $0,41 \pm 0,02$  vs.  $0,44 \pm 0,02$ ). Nach Hinzugabe von 60  $\mu\text{M}$  NCA kam es zu keinem signifikantem Anstieg der diastolischen Kalziumkonzentration in den beiden Gruppen ( $0,44 \pm 0,02$  vs.  $0,48 \pm 0,03$ ).



**Abb. 3.9:** Effekt von NCA (60  $\mu\text{M}$ ) auf die diastolische Sarkomerlänge (SL) und die diastolische intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration von ventrikulären Kardiomyozyten isoliert aus mit NaCl-Infusion (NaCl) oder chronischer Isoprenalin-Infusion (ISO) behandelten Mäusen. Messungen wurden in 1,25 mM extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  und mit einer elektrischen Stimulation von 1 Hz und 15 V durchgeführt. Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben. Nicht signifikant  $p > 0,05$  vs. basal. Die Anzahl der Zellen ist in den Säulen angezeigt.



Die Sarkomerlängenverkürzung und die intrazellulären Kalziumtransienten unterschieden sich nicht unter basalen Bedingungen zwischen der NaCl- und Iso-Gruppe (Abb. 3.10). Mit Zugabe von NCA kam es erwartungsgemäß zu einem ähnlichen Anstieg der Sarkomerlängenverkürzung (+250% in der NaCl-Gruppe vs. +230% in der Iso-Gruppe). Auch die Amplitude der Kalziumtransienten stieg unter Einfluss von NCA in beiden Gruppen gleichermaßen an (+153% in der NaCl-Gruppe vs. +149% in der Iso-Gruppe). Insgesamt zeigte NCA eine ungefähr zweifach stärkere Wirkung auf die Sarkomerlängenverkürzung als auf die Kalziumtransienten der Kardiomyozyten.

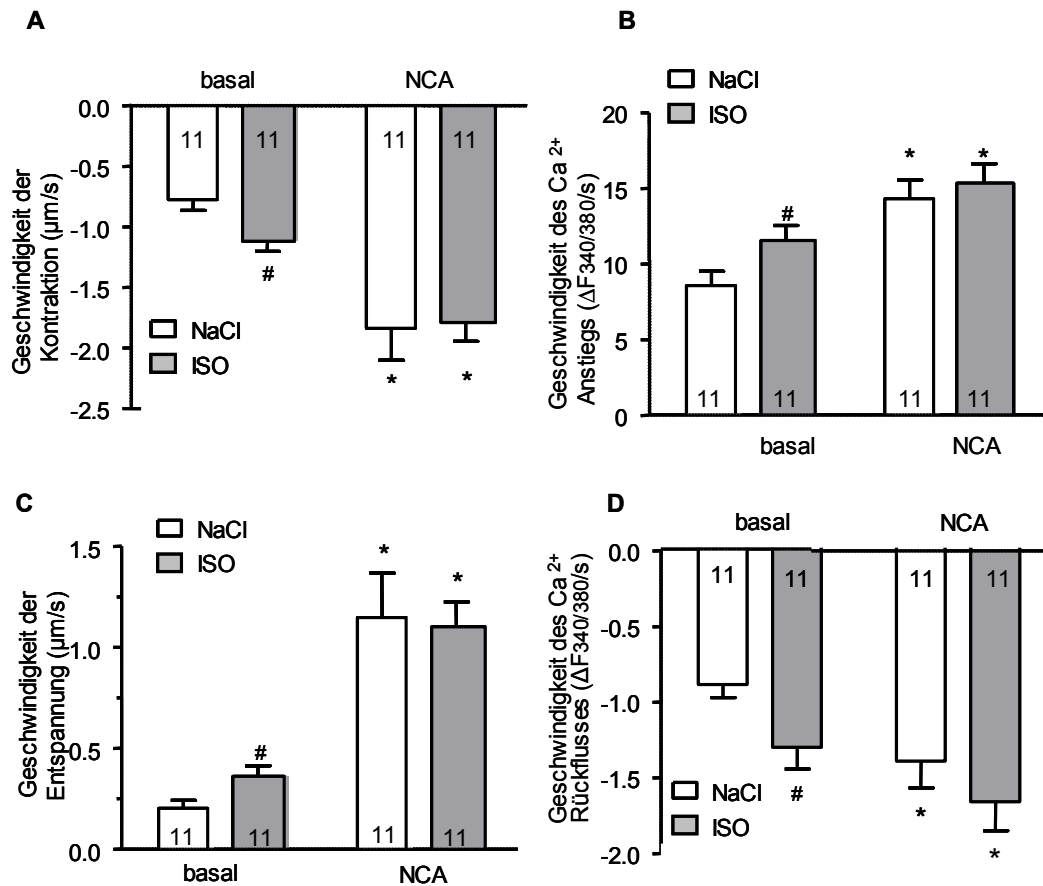


**Abb. 3.10:** Effekt von NCA (60  $\mu$ M) auf die Sarkomerlängenverkürzung und die  $Ca^{2+}$  transienten von ventrikulären Kardiomyozyten isoliert aus Mäusen behandelt mit NaCl-Infusion (NaCl) oder chronischer Isoprenalin-Infusion (ISO). Messungen wurden in 1,25 mM extrazellulärem  $Ca^{2+}$  und mit einer elektrischen Stimulation von 1 Hz und 15 V durchgeführt. Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben. \* $p < 0.05$  vs. basal. Die Anzahl der Zellen ist in den Säulen angezeigt.

Die Geschwindigkeiten der Sarkomerlängenverkürzung und -entspannung, sowie des Kalziumanstiegs und -rückflusses sind in der Abbildung 3.11 dargestellt. Die maximale Geschwindigkeit der Kontraktion sowie der Entspannung war unter Ausgangsbedingungen in der NaCl-Gruppe geringer als in der Iso-Gruppe (-30% und -44%). Nach Applikation von NCA erhöhte sich die Geschwindigkeit der Kontraktion und der Entspannung in der Kontrollgruppe um

166% und 614%. Hingegen erhöhte sich die Geschwindigkeit der Kontraktion und der Entspannung in der Iso-Gruppe um 73% und 240%. Unter Einfluss von NCA war der Anstieg der Geschwindigkeit der Kontraktion und der Entspannung um 93% und 374% in der Iso-Gruppe geringer. Jedoch war der Maximalwert der Geschwindigkeit der Kontraktion, der unter NCA-Einfluss erreicht wurde in beiden Gruppen gleich ( $-1,8 \mu\text{m/s}$ ). Auch der Maximalwert der Geschwindigkeit der Entspannung war identisch ( $1,15 \mu\text{m/s}$ ).

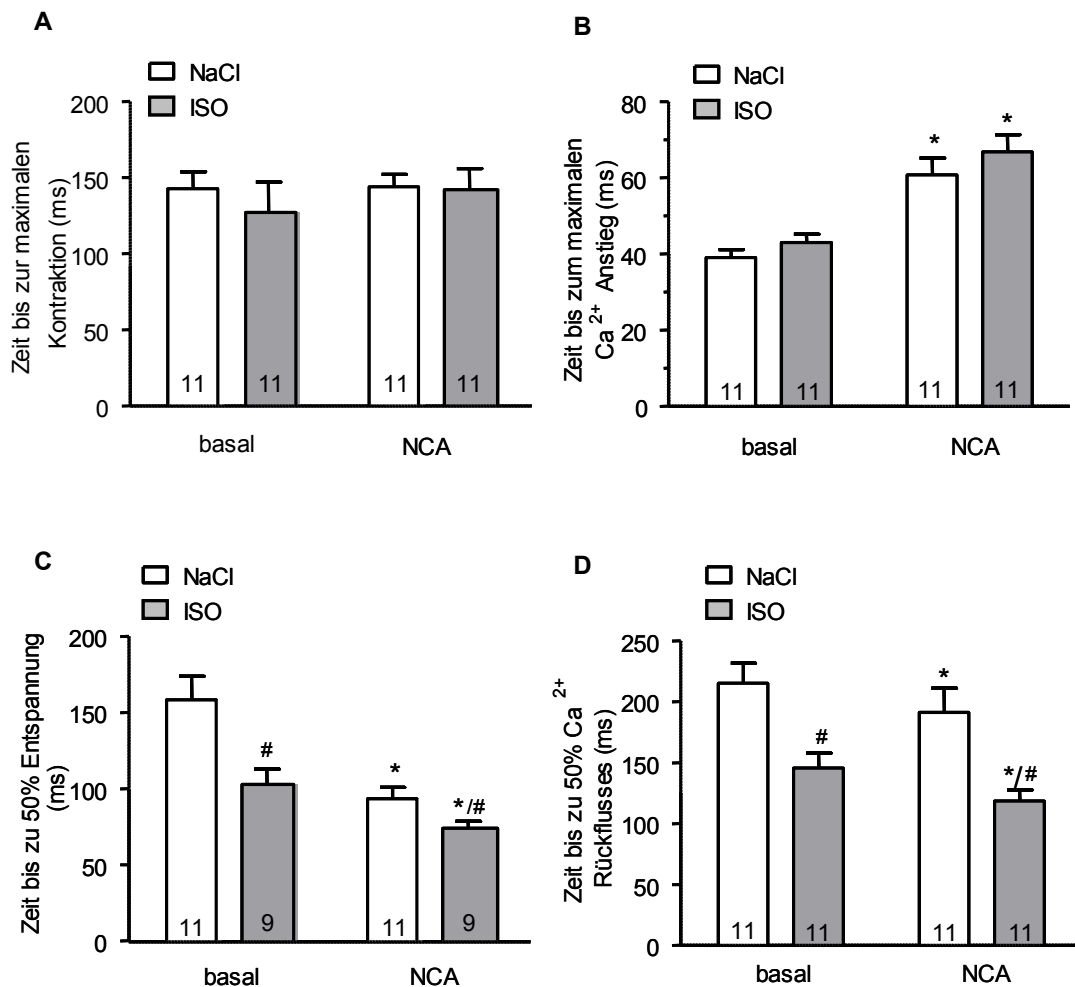
Die Geschwindigkeiten des Kalziumanstiegs und -rückflusses zeigten eine ähnliche Tendenz: Unter basalen Bedingungen waren auch hier die Geschwindigkeiten des Kalziumanstiegs und -rückflusses in der NaCl-Gruppe geringer als in der Iso-Gruppe ( $-26\%$  und  $-31\%$ ). Unter NCA-Einfluss stieg die Geschwindigkeit des Kalziumanstiegs und -rückflusses in der Kontrollgruppe um 82% und 67%, hingegen in der Iso-Gruppe um 40% und 29%. Auch hier war der Anstieg der Geschwindigkeit der Kontraktion und Entspannung nach NCA Gabe in der Iso-Gruppe insgesamt niedriger als in der NaCl-Gruppe, jedoch wurde wiederum ein ähnlicher Maximalwert in beiden Gruppen erreicht.



**Abb. 3.11:** Effekte von NCA ( $60 \mu\text{M}$ ) auf die simultan gemessenen maximalen Geschwindigkeiten von Kontraktion (A) und Entspannung (B) sowie  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg (C) und  $\text{Ca}^{2+}$ -Rückfluss (D) von ventrikulären Kardiomyozyten isoliert aus Mäusen behandelt mit NaCl-Infusion (NaCl) oder chronischer Isoprenalin-Infusion (ISO). Messungen wurden in  $1,25 \text{ mM}$  extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  und mit einer elektrischen Stimulation von  $1 \text{ Hz}$  und  $15 \text{ V}$  durchgeführt. Werte sind als Mittelwerte  $\pm \text{SEM}$  angegeben. \* $p < 0.05$  vs. basal; # $p < 0.05$  vs. NaCl. Die Anzahl der Zellen ist in den Säulen angezeigt.

Die Untersuchung der Zeitspanne zwischen Stimulation der Zelle und der maximalen Amplitude einer Kontraktion war in beiden Gruppen sowohl unter basalen Bedingungen als auch unter NCA Einfluss gleich. Die Zeitspanne zwischen der Stimulation und dem Erreichen der maximalen Kalziumamplitude war ebenfalls basal in der Kontrollgruppe und in der Iso-Gruppe gleich, verlängerte sich jedoch mit  $60 \mu\text{M}$  NCA in beiden Gruppen um  $56\%$ . Vergleichbar mit der Geschwindigkeit der Entspannung war unter Ausgangsbedingungen die Zeit-

spanne zwischen maximaler Amplitude und halbmaximaler Entspannung in der Iso-Gruppe um 38% geringer als in der Kontrollgruppe. Unter NCA Einwirkung verringerte sich die Zeitspanne zwischen maximaler Amplitude und halbmaximaler Entspannung in der NaCl-Gruppe um 62% und in der Iso-Gruppe um 77%. Auch die Zeitspanne zwischen maximalem und halbmaximalem Kalziumrückfluss war in der Iso-Gruppe um 32% geringer als in der NaCl-Gruppe. Nach Applikation von NCA verringerte sich die Zeitspanne zwischen maximalem und halbmaximalem Kalziumrückfluss sowohl in der NaCl- als auch in der Iso-Gruppe (87% vs. 83%). Interessanterweise kam es hier unter NCA-Wirkung zu einem unterschiedlich starken Ansprechen zwischen der Iso-Gruppe und der NaCl-Gruppe. Die Iso-Gruppe zeigte eine signifikant kürzere Zeitspanne zwischen maximaler und halbmaximaler Entspannung als auch zwischen maximalen und halbmaximalen Kalziumrückfluss gegenüber der NaCl-Gruppe.



**Abb. 3.12:** Effekte von NCA (60  $\mu\text{M}$ ) auf die Zeit zwischen Zellstimulation und maximaler Kontraktion (A) sowie maximaler Amplitude des Kalziumtransienten (B) und Effekte auf die Zeit zwischen maximaler Kontraktion und halbmaximaler Kontraktion (C), sowie maximaler  $\text{Ca}^{2+}$  Amplitude und halbmaximaler  $\text{Ca}^{2+}$  Amplitude von ventrikulären Kardiomyozyten isoliert aus Mäusen behandelt mit NaCl-Infusion (NaCl) oder chronischer Isoprenalin-Infusion (ISO). Messungen wurden in 1,25 mM extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  und mit einer elektrischen Stimulation von 1 Hz und 15 V durchgeführt. Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben. \* $p < 0,05$  vs. basal; # $p < 0,05$  vs. NaCl. Die Anzahl der Zellen ist in den Säulen angezeigt.

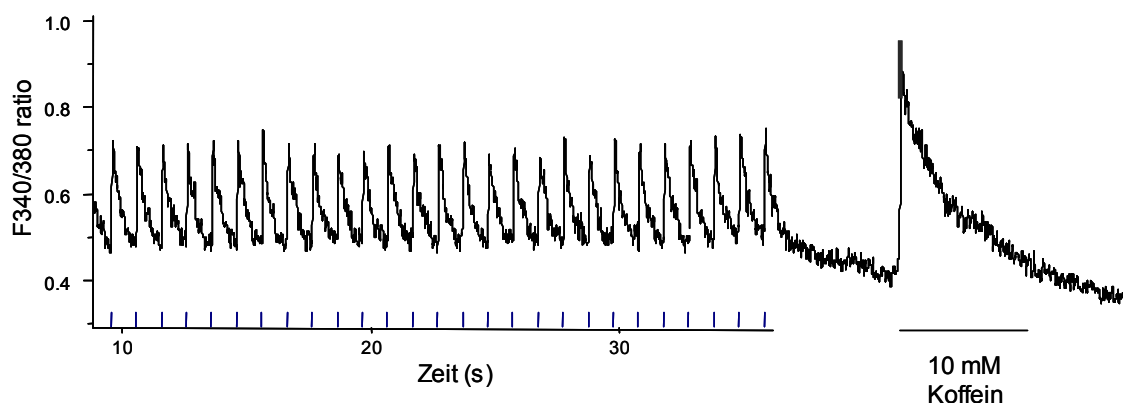
### 3.4.3 Zusammenfassung

Im Folgenden eine kurze Zusammenfassung der veränderten Kurvenparameter unter 60  $\mu\text{M}$  NCA-Einfluss:

- (a) NCA hatte einen Einfluss auf die Kalziumtransienten der Kontrollgruppe sowie auf die der chronisch  $\beta$ -adrenerg behandelten Gruppe.
- (b) Die diastolische Kalziumkonzentration blieb nach NCA-Gabe gleich.
- (c) Unter Einfluss von NCA kam es zu einem stärkeren Anstieg der Sarkomerlängenverkürzung als der Kalziumionenzirkulation.
- (d) Geschwindigkeiten der Kontraktion, der Entspannung, des Kalziumanstiegs und -rückflusses waren in der Iso-Gruppe schneller als in der NaCl-Gruppe.
- (e) Insgesamt war der Maximalwert aller Geschwindigkeiten unter NCA in der NaCl- und Iso-Gruppe gleichermaßen beeinflusst.
- (f) Die Zeit zur Entspannung und zum Kalziumrückfluss war sowohl basal als auch unter NCA in der Iso-Gruppe schneller.

### 3.5 Wirkung von NCA auf das Sarkoplasmatische Retikulum

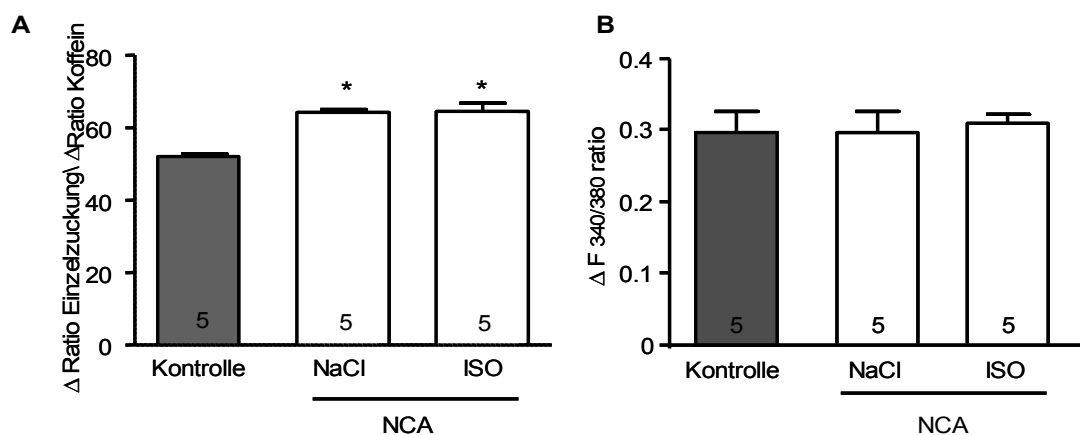
Das vom NCA-Donator freigesetzte HNO bewirkte eine verstärkte Kalziumionenzirkulation innerhalb der Zelle. Es stellte sich nun die Frage, ob dieser Effekt durch eine Aktivierung des Sarkoplasmatischen Retikulums (SR) begründet sei. Hierzu wurden die Kardiomyozyten mit Fura-2 beladen. Anschließend wurden die Kalziumtransienten der Kardiomyozyten unter Stimulation mit 1 Hz und 15 V aufgezeichnet. Die Messung der Kalziumtransienten erfolgte unter basalen Bedingungen oder unter NCA-Einfluss. Nach einer stabilen Kalziumtransienten Kurve wurde die Stimulation gestoppt und es folgte die Applikation von 10 mM Koffein innerhalb kurzer Zeit. Die Zugabe von Koffein bewirkte eine abrupte Freisetzung des gesamten SR-Kalziumgehalts, wodurch sich ein koffeininduzierter Kalziumtransient bildete (Abb. 3.13).



**Abb. 3.13:** Kalziumtransienten einer stimulierten (1 Hz/ 15 V) Herzmuskelzelle mit Koffein induzierter Kalziumkurve.

Die folgenden Abbildungen stellen die Parameter der Koffein induzierten Kalziumkurven dar. Die Applikation von Koffein erfolgte auf drei verschiedene Gruppen. Zum einen wurde der Koffein induzierte Kalziumtransient von Kardiomyozyten aus Wildtyp-Mäusen (C57Bl/6J), die keinen Zusatz von Substanzen erhielten, erfasst. Diese Gruppe diente als Kontrollgruppe. Zum anderen wurden die Koffein induzierten Kalziumtransienten der NaCl- behandelten sowie chronisch  $\beta$ -adrenerg behandelten Kardiomyozyten, allerdings nach Zugabe

von 60  $\mu\text{M}$  NCA, aufgezeichnet. Abbildung 3.14 A zeigt die Abgabefraktion des Kalziums aus dem SR gemessen aus dem Quotienten der einzelnen Kalziumtransienten und den Koffein induzierten Kalziumtransienten. Unter dem Einfluss von NCA kam es zu einer erhöhten Freisetzung von Kalzium aus dem SR sowohl in der NaCl- als auch in der Isoprenalin behandelten Gruppe. In den beiden Gruppen kam es zu einem signifikanten Anstieg von 24% gegenüber der Kontrollgruppe. Trotz der Erhöhung der Kalziumabgabefraktion blieb der Kalziumgehalt des SR nach NCA-Gabe gleich (Abb. 3.14 B).

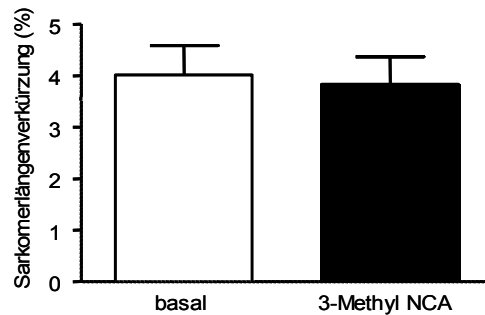


**Abb. 3.14:** Koffein (10 mM) induzierte Kalziumtransientenmessung des Sarkoplasmatischen Retikulums (SR) von Kardiomyozyten aus unbehandelten Mäusen (Kontrolle) und behandelten Mäusen (chronische NaCl- oder Isoprenalin-Infusion) mit und ohne Einfluss von 60  $\mu\text{M}$  NCA. (A) SR Ca<sup>2+</sup> Abgabefraktion: Quotient aus Einzelzuckungen und der Amplitude des Koffein induzierten Transienten ausgedrückt in Prozent; (B). Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben. \* $p < 0.05$  vs. Kontrolle. Die Anzahl der Zellen ist in den Säulen angezeigt.

### 3.6 Überprüfung der pharmakologisch wirksamen Substanz

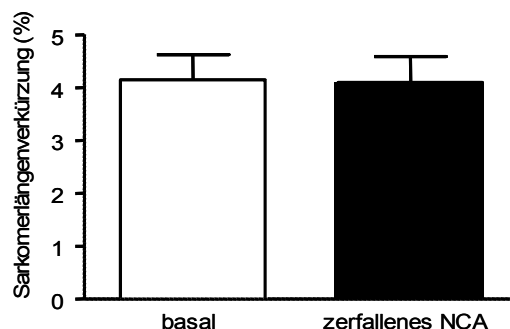
Im Allgemeinen erschwert die Verwendung von Donatoren die Interpretation von Ergebnissen, deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit auf die Durchführung von Kontrollexperimenten Wert gelegt. Bei der Arbeit mit Donatoren ist es grundsätzlich immer möglich, dass die Struktur der Donatoren selbst Effekte verursacht. Um dies zu überprüfen kam es zum Einsatz von 3-Methyl NCA, einem

modifizierten Donator, welcher eine kovalente Bindung zum HNO-Molekül aufweist und somit kein HNO freisetzt. Wie in der Abbildung 3.15 dargestellt, konnte unter Einfluss von 135  $\mu\text{M}$  3-Methyl NCA kein signifikanter Unterschied der Sarkomerlängenverkürzung festgestellt werden.



**Abb. 3.15:** Keine Veränderung der relativen Sarkomerlängenverkürzung von stimulierten (1 Hz/15 V) Kontrollzellen unter Einfluss von 135  $\mu\text{M}$  3-Methyl NCA. Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben. Nicht signifikant;  $p > 0,05$  vs. basal; Student's t-test.

Weitere Kontrollexperimente mit zerfallenem NCA wurden durchgeführt, um einen möglichen Effekt von Zerfallsprodukten und Unreinheiten im Donator zu überprüfen. Hierzu wurde eine 2 M NCA Lösung eine halbe Stunde lang bei 37 °C und dann über Nacht bei Raumtemperatur gelagert. Die Lösung war während dieser Zeit auch dem Tageslicht ausgesetzt. Anschließend erfolgte die Applikation von 120  $\mu\text{M}$  zerfallenem NCA auf die Kardiomyozyten. Es konnte keine signifikante Änderung der Sarkomerlängenverkürzung festgestellt werden.



**Abb. 3.16:** Keine Veränderung der relativen Sarkomerlängenverkürzung von stimulierten (1 Hz/15 V) Kontrollzellen unter Einfluss von 120  $\mu\text{M}$  zerfallenem NCA. Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben. Nicht signifikant;  $p > 0,05$  vs. basal; Student's t-test.



## 4. Diskussion

Eine große Anzahl bisheriger Studien zur Ermittlung der biologischen Effekte von HNO wurden über Jahrhunderte mit Hilfe des Donators *Angeli's Salz* durchgeführt (s. Abb. 1.4). Der *in vivo* Einsatz von AS ist jedoch aufgrund der kurzen Halbwertszeit, der Bolusabgabe von HNO sowie der gleichzeitigen Freisetzung des Nebenproduktes Nitrit limitiert. Zusätzliche Probleme in der Bewertung der Experimente ergeben sich durch die Löslichkeit von AS in NaOH, was zu pH-Wert Veränderungen in biologischen Systemen führen kann (Fukuto et al. 2008). Daher wird aktuell intensiv an der Entwicklung eines reinen und lang anhaltenden HNO-Donators geforscht.

Ein neues attraktives Molekül mit diesen Eigenschaften stellt das 1-Nitroso-cyclohexyl Acetat (NCA) dar. Die kontinuierliche Abgaberate von HNO bei einem physiologischen pH von 7,4, das Ausbleiben von biologisch wirksamen Nebenprodukten sowie die Möglichkeit zur Variation der HNO-Abgaberate könnten Unsicherheiten bei der Interpretation von Ergebnissen verhindern.

Vorangegangene Untersuchungen mit dem neuartigen Donator NCA an normalen Kardiomyozyten und am isolierten Herzen konnten zeigen, dass HNO einen positiv inotropen Effekt aufweist. In Anbetracht dessen galt es als Ziel dieser Studie herauszufinden, ob der HNO-Donator NCA das Potenzial hat, die Kontraktilität auch in einem pathologischen Modell, also in hypertrophierten,  $\beta$ -adrenerg desensibilisierten Kardiomyozyten, zu steigern. Zusätzlich erfolgten Versuche zur Beurteilung einer möglichen Einflussnahme auf die Kalziumzirkulation.

#### 4.1 Hypertrophie induziert durch chronische $\beta$ -adrenerge Stimulation

Die myokardiale Hypertrophie ist eine wichtige Vorstufe zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz. In den Experimenten wurde diese durch chronische  $\beta$ -adrenerge Stimulation induziert. Wir entschieden uns in dieser Arbeit für die Anwendung eines Isoprenalin-Infusions-Modells: Zum einen ist das Isoprenalin-Infusions-Modell einfach anzuwenden und kostengünstig. Des Weiteren zeigt es eine geringe Mortalität und Variabilität der Versuchstiere im Vergleich zu anderen Hypertrophie-Modellen wie beispielsweise dem häufig zum Einsatz kommenden TAC- (*transaortic constriction*) Modell. Das TAC-Modell stellt ein invasiveres Verfahren dar und zeigt durch die Höhe der gesetzten Ligatur an der Aorta eine Variabilität in dem Ausmaß der Hypertrophieentwicklung. Zudem stellt das TAC-Modell eine Situation dar, die in dieser Form nicht am menschlichen Herz auftritt. Hingegen spielen in dem von uns verwendeten Isoprenalin-Infusions-Modell die Katecholamine eine entscheidende Rolle, wie nach heutigem Erkenntnisstand auch in der Entstehung der menschlichen Herzinsuffizienz. Sogar auf molekularer Ebene weisen die Veränderungen, welche durch Isoprenalininfusion hervorgerufen werden, Ähnlichkeiten mit der menschlichen Herzinsuffizienz auf, darunter die Verminderung der  $\beta$ 1- und  $\beta$ 2-Adrenozeptordichte (Mende et al. 1992) und die Reduktion der PLB und SERCA2a Expression (Linck et al. 1998).

Dass dieses Modell eine Herzhypertrophie hervorruft, ist anhand der Zunahme der linksventrikulären Masse (LVM) ersichtlich (+ 27%).

Natürlich gibt es auch bei diesem Modell Einschränkungen der Aussagekraft. Der Ursache der menschlichen Herzinsuffizienz liegt oft dem Zusammenspiel multifaktorieller Störungen zugrunde. Das Isoprenalin-Infusions-Modell hingegen berücksichtigt nur einen Faktor, den erhöhten Katecholaminspiegel. Darüber hinaus kann der zeitliche Verlauf in der menschlichen Pathogenese der Herzinsuffizienz nicht simuliert werden.

## 4.2 Pharmakologische Untersuchungen der myokardialen Kontraktilität

Pharmakologische Versuche zur Untersuchung der myokardialen Kontraktilität sind ein zentrales Thema in der Kardiologie und Herzinsuffizienzforschung und werden schon sehr lange durchgeführt. Die experimentellen *in vitro* Untersuchungen wurden an isolierten Kardiomyozyten vorgenommen. Dabei zeigt die Einzelzellmethode Vorteile gegenüber Untersuchungen an multizellulären Streifenpräparaten hinsichtlich der Unabhängigkeit von extrakardiomyozytären Faktoren. Beispielsweise enthalten Muskelstreifenpräparate Endothelzellen und Fibroblasten in großer Anzahl, welche kardioaktive Substanzen freisetzen und somit Einfluss auf das Kontraktionsverhalten der Zellen nehmen können. Zudem bestehen bei der Einzelzellmethode keine Perfusionshindernisse. Es liegen somit keine langen Diffusionswege vor, die zu einer ungleichen Verteilung von Sauerstoff, extrazellulären Ionen und pharmakologischen Versuchssubstanzen führen können. In den Experimenten wurde die Kontraktilität als Verkürzung der Sarkomere gemessen.

### 4.2.1 Wirkung von Isoprenalin auf die Kontraktilität von Kardiomyozyten nach chronischer $\beta$ -adrenerger Stimulation

Bei der Entstehung einer chronischen Herzinsuffizienz ist der Organismus einer dauerhaften adrenergen Stimulation (hohen Katecholaminspiegeln) ausgesetzt. Am Myokard kommt es dabei zur *Downregulation* der  $\beta_1$ -Adrenozeptoren sowie zu einer Desensibilisierung der nachgeschalteten Signaltransduktionswege (Bristow et al., 1982). Dies ist ein Mechanismus mit dem sich das Herz der chronischen  $\beta$ -adrenergen Überstimulation entzieht. Als Konsequenz daraus kommt es zur reduzierten Antwort des Herzens auf adrenerge Agonisten. So zeigen Katecholamine (z.B. Dobutamin) bei Patienten mit einer Herzinsuffizienz sowie in Kardiomyozyten, isoliert aus ventrikulären insuffizienten Menschenherzen, nur einen gering positiv inotropen Effekt (Böhm M et al. 1988, Colucci WS et al. 1988). Die  $\beta$ -adrenerge Desensibilisierung als charakteristische Veränderung des insuffizienten Herzens und der einzelnen Herzmuskelzelle wurde

von vielen Arbeitsgruppen unter anderem Osadchii et al. (2007) durch chronische Katecholamininfusion in Nagetieren reproduziert.

Auch in der vorliegenden Arbeit kam es zum Einsatz eines solchen Isoprenalin-Infusions-Modells. Nach einer 5-tägigen Infusion entweder mit Isoprenalin in der behandelten Gruppe oder mit NaCl in der Kontrollgruppe wurden die Herzen präpariert und die Kardiomyozyten isoliert. Anschließend erfolgte die Sarkomerlängenmessung der Myozyten. Dabei wurde 1  $\mu$ M des  $\beta$ -Adrenozeptoragonisten Isoprenalin akut appliziert. Erwartungsgemäß konnte auch hier die  $\beta$ -adrenerge Desensibilisierung bestätigt werden, denn die Sarkomerverkürzung durch Isoprenalin war in der Gruppe der Kardiomyozyten, welche die chronische Isoprenalininfusion erhielten um 63% geringer, als in der Kontrollgruppe. Unter dieser maximalen Isoprenalingabe verkürzten sich die Zellen in der Kontrollgruppe somit um 9,04%, in der mit Isoprenalin behandelten Gruppe hingegen lediglich um 3,35%.

Insgesamt konnte in diesen Versuchen entsprechend den Untersuchungen an insuffizienten Patientenherzen *in vivo* und an humanen pathologischen Kardiomyozyten *in vitro*, trotz unterschiedlicher Messmethode eine  $\beta$ -adrenerge Desensibilisierung nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu haben weitere Arbeitsgruppen gezeigt, dass die Kontraktilität von hypertrophierten und insuffizienten Kardiomyozyten unter basalen Bedingungen, also ohne Zusatz von Substanzen wie Katecholaminen oder Ionen gleich bleibt (Houser and Margulies 2003). Die unveränderte Kontraktilität nach Entwicklung der Hypertrophie mit  $\beta$ -adrenerger Desensibilisierung, gemessen als FAS *in vivo*, konnte auch in dieser Arbeit bestätigt werden. Ebenso zeigten die Kontraktilitätsmessungen *in vitro*, gemessen als Sarkomerlängenverkürzung keinen Unterschied zwischen Kontrollzellen und chronisch  $\beta$ -adrenerg behandelten Herzzellen unter Ausgangsbedingungen.

#### 4.2.2 Wirkung von NCA auf die Kontraktilität von Kardiomyozyten nach chronischer $\beta$ -adrenerger Stimulation

Die Sarkomerlänge von intakten Kardiomyozyten, isoliert aus Mäuseherzen mit 5 tägiger NaCl- oder Isoprenalin Behandlung, wurde unter dem Einfluss von NCA überprüft. Konzentrationen von 7,5 bis 120  $\mu\text{M}$  NCA wurden eingesetzt. Die Untersuchung zeigte eine konzentrationsabhängige Zunahme der Kontraktilität mit jeweils gleichem Anstieg in beiden Gruppen. Dabei wurde nach Applikation einer einzelnen Konzentration auf eine Zelle der entsprechende Effekt untersucht, um den Einfluss der jeweiligen Konzentration präziser darstellen zu können. Zudem wurden an einem Versuchstag verschiedene Konzentrationen an den Kardiomyozyten aus einem Herzen untersucht. Es wurde vermieden nur eine bestimmte Konzentration an Kardiomyozyten eines Herzen zu untersuchen, mit dem Ziel der Durchmischung und genaueren Überprüfung der Reproduzierbarkeit. Ein möglicher Schwachpunkt der Messungen könnte in der Applikation von NCA liegen. NCA wurde aus Kostengründen mit Hilfe einer Pipette direkt in die Messkammer überführt. Um nach Zugabe allerdings eine ungleiche Verteilung von NCA zu verhindern, wurde eine manuelle Durchmischung vorgenommen. Zudem sollte auch die langsame und kontinuierliche Freisetzung von HNO aus NCA genügend Zeit für eine gleichmäßige Verteilung des Donators bieten. Die Kardiomyozyten wurden nach den im Methodenteil 2.5.1 genannten Qualitätskriterien selektiert. Zusätzlich kam es zur Verwendung von DTPA mit dem Ziel der Konversionshemmung von HNO zu NO, um sicherzugehen, dass die beobachteten Effekte auf HNO beruhen.

Die maximal tolerierbare Konzentration von NCA war 120  $\mu\text{M}$ . Höhere Konzentrationen konnten zwar die Kontraktilität weiter steigern, führten jedoch zur Beeinträchtigung der basalen Kontraktilität der Zelle. Der Effekt des vom NCA-Donator freigesetzten HNO war dabei stets reversibel. Unter dem Einfluss von 120  $\mu\text{M}$  NCA wurde jedoch nur noch eine stark reduzierte systolische Verkürzung von  $\sim 1\%$  erreicht, sodass man bei Konzentrationen über 120  $\mu\text{M}$  NCA von einem toxischem Effekt auf die Einzelzelle ausgehen kann. Nach Hinzugabe von 120  $\mu\text{M}$  konnte ein geringes Absinken der diastolischen Sarkomerlänge

beobachtet werden (siehe Abb. 3.7). Dies entspricht einer verminderten Fähigkeit zur vollständigen Relaxation. Ein möglicher Grund dafür könnte die starke Zunahme der Kontraktilität sein (+ 200%), die zu einem erhöhten Kalziumangebot innerhalb der Zelle führt und somit das Absinken der diastolischen Sarkomerlänge erklären könnte.

Unter dem Einfluss von NCA kam es zu einem gleichartigen Anstieg der Kontraktilität in normalen Kardiomyozyten sowie in den  $\beta$ -adrenerg desensibilisierten und hypertrophierten Kardiomyozyten. Dabei konnte in den hypertrophierten Zellen sogar der maximale Effekt von Isoprenalin auf normale Zellen erreicht werden (siehe Abb. 3.2). Erwartungsgemäß zeigte Isoprenalin im Unterschied zu NCA eine verminderte positiv inotrope Antwort auf die  $\beta$ -adrenerg desensibilisierten und hypertrophierten Kardiomyozyten (siehe Abb. 3.2). Insgesamt implizieren diese Daten, dass NCA in gleicher Weise auf normale und  $\beta$ -adrenerg desensibilisierte Zellen wirkt. Die Wirkung von NCA bzw. HNO auf die  $\beta$ -adrenerg desensibilisierten Kardiomyozyten im Gegensatz zu Isoprenalin weist auf einen von der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade, also vom cAMP unabhängigen Signalweg hin. So zeigten *in vitro* Experimente von Tocchetti et al. (2007) an isolierten Kardiomyozyten der Maus, die unter ähnlichen experimentellen Bedingungen durchgeführt wurden, einen cAMP- sowie cGMP-unabhängigen Signalweg von HNO. Auch *in vivo* Studien an insuffizienten Hundeherzen belegten eine Unabhängigkeit vom cAMP- und cGMP-Signalweg (Paolocci et al. 2003). Vielmehr bewirkt HNO einen Kontraktionsanstieg über eine direkte Modulation der RyR2 Rezeptoren und der SERCA2a (Tocchetti et al. 2007, Lancel et al. 2009). All diese Arbeitsgruppen verwendeten jedoch *Angeli's Salz* als HNO-Donator.

*Angeli's Salz* (AS) gehört zu den am besten untersuchten HNO-Donatoren. Auch in dieser Arbeit wurde der Effekt von AS überprüft. Die Hinzugabe von 500  $\mu$ M AS führte zu einer Steigerung der relativen Kontraktilität der Kardiomyozyten gegenüber basal um 86% vergleichbar mit den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen (Tocchetti et al. 2007). Dies deutet auf ähnliche experimentelle Bedingungen hin und folglich eine sehr gute Vergleichbarkeit der Daten. Die

EC<sub>50</sub> des positiv inotropen Effekts von NCA lag in der vorliegenden Arbeit bei einer Konzentration von ~ 55 µM, welches unter gleichen experimentellen Bedingungen ~50 fach kleiner ist, als die beschriebene EC<sub>50</sub> von AS (Tocchetti et al. 2007). NCA hat somit eine höhere Potenz als AS. Dies und die anderen Vorteile von NCA gegenüber AS (siehe Einleitung unter 1.5) unterstreichen das Potenzial von NCA als neuen HNO-Donator.

### **4.3 Wirkung von NCA auf die Kalzium-Homöostase**

Die Untersuchungen an normalen und hypertrophierten Myokardzellen mit dem Donator NCA konnten zeigen, dass dessen kontinuierliche Abgabe von HNO mit einer Erhöhung der Kontraktion und Relaxation einherging. Um darüber hinaus die Rolle von NCA auf die Kalzium-Homöostase bewerten zu können, wurde in einer weiteren Reihe von Experimenten die intrazelluläre Kalziumkonzentration simultan zur Sarkomerlängenverkürzung gemessen. Diese erfolgte über eine Fluoreszenzmessung mit Fura-2 AM beladenen Zellen. Mit dem Ziel optimale und vergleichbare Messungen zu erhalten, erfolgte die Durchführung der Versuche bei einer extrazellulären Kalziumkonzentration von 1,25 mM. Die Konzentration von 60 µM NCA, nahe der EC<sub>50</sub> von ungefähr 55 µM, wurde verwendet, um die Kurvenparameter der Sarkomerlänge sowie der Kalziumtransienten zu erfassen.

Bisherige Studien belegten, dass HNO eine erhöhte Kontraktilität durch eine verstärkte Kalziumionenzirkulation innerhalb der Zelle verursacht (Paolucci et al. 2007, Tocchetti et al. 2007). Auch in der vorliegenden Arbeit ging die Erhöhung der Kontraktion in Anwesenheit von HNO mit einer Erhöhung des Kalziumumsatzes einher. Das vom NCA freigesetzte HNO führte zu einer Sarkomerlängenverkürzung von ~250% und zu einer Erhöhung des Kalziumtransienten von ~120% in normalen, sowie in β-adrenerg desensibilisierten Kardiomyozyten (siehe Abb. 3.10). Insgesamt zeigte NCA eine ungefähr zweifach stärkere Wirkung auf die Sarkomerlängenverkürzung als auf die Kalziumtransienten der Kardiomyozyten. Dies unterstreicht den bereits bekannten Effekt von HNO auf die Kraftentwicklung des Herzen. Zusätzlich zur Erhöhung der

sarkoplasmatischen Kalziumzirkulation steigert HNO auch die Kraftentwicklung der Myofilamente mittels Kalzium-Sensitivierung (Dai et al. 2007, Tocchetti et al. 2007). Dies scheint mit einer Modulation der Myofilamentproteine, welche Thiolgruppen enthalten, einherzugehen (Dai et al. 2007). Folglich resultiert die positive Inotropie von HNO aus einer Steigerung des systolischen Kalziumumsatzes, sowie einer Erhöhung der Sensitivität der Myofilamente gegenüber dem Kalzium. Interessanterweise scheinen diese Ergebnisse über direkte Interaktionen des HNO mit spezifischen Cysteinresten vermittelt zu sein (Kohr et al. 2011).

Die Kurvenparameter der Zeit und der Geschwindigkeit wiesen bereits unter den Ausgangsbedingungen (basalen Bedingungen) Unterschiede zwischen der Iso- und der Kontrollgruppe auf. Die maximale Geschwindigkeit der Entspannung, sowie des Kalziumrückflusses war unter Ausgangsbedingungen in der Kontrollgruppe langsamer als in der chronisch  $\beta$ -adrenerg behandelten Gruppe (-44% und -30%). Vergleichbar mit der Geschwindigkeit der Entspannung war unter Ausgangsbedingungen die Zeitspanne zwischen maximaler Amplitude und halbmaximaler Entspannung in der Iso-Gruppe um 38% geringer als in der Kontrollgruppe. Auch die Zeitspanne zwischen maximalem und halbmaximalem Kalziumrückfluss war in der Iso-Gruppe um 32% geringer als in der NaCl-Gruppe. Es ist unerwartet, dass pathologische Zellen mit chronischer  $\beta$ -adrenerger Behandlung schneller relaxieren, als normale Zellen.

In der Literatur ist bekannt, dass eine  $\beta$ -adrenerge Desensibilisierung mit einer reduzierten Auswurfleistung des Herzen, einer prolongierten Relaxationsgeschwindigkeit der Myofilamente sowie einer verminderten Kalziumionenzirkulation des Sarkoplasmatischen Retikulums einhergeht (El Armouche und Eschenhagen 2008). Zudem zeigen viele Daten eine Hypophosphorylierung von Phospholamban, Troponin I und dem Myosin-bindenden Protein C (cMyBP-C), welche z.T. das Relaxationsdefizit bei insuffizienten Herzen erklären (Bartel et al. 1996, Bodor et al. 1997). Insgesamt wurden bisher viele Tiermodelle in der Literatur verwendet, um den möglichen kausalen Zusammenhang zwischen Hypertrophie und veränderter Relaxation zu erklären (Linck et al. 1998). Bei-



spielsweise veränderte eine Thyroid-Hormon induzierte Hypertrophie die Relaxation sowie die Expression von SR Proteinen. Es kam zu einer Abnahme der PLB (mRNA und Protein) und zu einer Zunahme der SERCA (mRNA und Protein) Expression. Begleitend erhöhte sich die  $Ca^{2+}$ -Aufnahme und es kam zu einer Verkürzung der Relaxationszeit (Linck et al. 1998). Wiederum gibt es auch mehrere Beispiele für die gleichzeitige Reduktion der PLB- und der SERCA-Spiegel. Beim *aortic banding* Modell (Aortenkonstriktion) waren sowohl die PLB, als auch die SERCA Protein Level reduziert. Hinzu kamen eine beeinträchtigte Relaxation und  $Ca^{2+}$ -Aufnahme (Kiss et al. 1995). Die Diskrepanz der Ergebnisse lässt sich unter anderem durch unterschiedliche Tiermodelle, sowie experimentelle Bedingungen erklären.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind in Übereinstimmung mit der Studie von Linck et al. (1998), welche das gleiche Isoprenalin-Infusions-Modell, jedoch mit Ratten verwendeten. Linck et al. erforschten hierbei die biochemischen und mechanischen Veränderungen nach chronisch  $\beta$ -adrenerg induzierter Hypertrophie. Auch hier kam es ähnlich wie in dieser Arbeit zu einer um 27% kürzeren Relaxationszeit in der Gruppe der chronisch Isoprenalin stimulierten Herzen im Vergleich zur NaCl behandelten Kontrollgruppe. Der maximale Kalziumrückfluss in das Sarkoplasmatische Retikulum war in der Gruppe mit chronischer  $\beta$ -adrenerger Stimulation gegenüber der Kontrollgruppe erhöht, entsprechend der schnelleren Geschwindigkeit und der kürzeren Zeitspanne des Kalziumrückflusses in der vorliegenden Arbeit. Die verkürzte Relaxationszeit begann bei den Versuchen von Linck et al. nach einem Tag Isoprenalin-Infusion, erreichte seinen maximalen Wert nach zwei Tagen und hielt über einen transienten Zeitraum von acht Tagen an. Zudem beobachteten Linck et al. eine transiente Reduktion der PLB und SERCA Expression auf Proteinebene. Die reduzierte PLB/SERCA Ratio könnte laut Linck et al. die transiente und schnelle Relaxationszeit nach chronischer  $\beta$ -adrenerger Stimulation erklären.

Zusammenfassend liegt die Vermutung nahe, dass die überraschend verminderte Relaxationszeit und die schnellere Kalziumwiederaufnahme der chronisch  $\beta$ -adrenerg behandelten Herzen im Gegensatz zu den Kontrollherzen im Zu-

sammenhang mit dem verwendeten Isoprenalin-Infusions-Modell stehen, bzw. zum Teil von den erhöhten Katecholaminspiegeln hervorgerufen werden und eher einen transienten Zustand darstellen. Zudem wird die Komplexität einer chronisch  $\beta$ -adrenergen Stimulation *in vivo* deutlich, die begleitet ist von transienten und ebenso von persistierenden Veränderungen in der Genexpression (El-Armouche und Eschenhagen 2008) und daraus folgend in der Herzfunktion.

Unter dem Einfluss von 60  $\mu$ M NCA kam es erwartungsgemäß sowohl in der NaCl- als auch in der Iso-Gruppe zu einem gleichen maximalen Anstieg der Relaxationsgeschwindigkeit und der Geschwindigkeit des Kalziumrückflusses. In der NaCl-Gruppe war die Amplitude des Anstiegs zwar höher, dies kann jedoch an den langsameren Geschwindigkeiten der NaCl-Gruppe unter den Ausgangsbedingungen liegen (wie oben beschrieben). Die Zeitspanne zwischen maximalem und halbmaximalem Kalziumrückfluss verkürzte sich nach Applikation von NCA in beiden Gruppen. Auch in den Versuchsreihen von Tocchetti et al. (2007) zeigten sich unter HNO-Einfluss eine Abnahme der Zeit des Kalziumrückflusses. Interessanterweise kam es hier unter NCA-Wirkung zu einem unterschiedlich starken Ansprechen. Die Iso-Gruppe zeigte eine signifikant kürzere Zeitspanne zwischen maximaler und halbmaximaler Entspannung, als auch zwischen maximalem und halbmaximalem Kalziumrückfluss gegenüber der NaCl-Gruppe. NCA zeigte somit ebenfalls einen stärkeren Effekt auf diese beiden Parameter in der Iso-Gruppe.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass es unter dem Einfluss des freigesetzten HNO aus NCA sowohl zu einem Anstieg der Kontraktion als auch zu einer Steigerung der Relaxation kam. Somit wirkt NCA auf die Kardiomyozyten, sowie das gesamte Herz positiv inotrop und lusitrop zugleich. Die Kombination dieser Wirkungen führt zu einer erhöhten Auswurfleistung des Herzens. Dies ist auch aus den in der Literatur durchgeführten *in vivo* und *in vitro* Studien bekannt, jedoch unter Verwendung anderer HNO-Donatoren wie dem häufig angewandten AS. (Paolucci et al. 2001 und 2003, Tocchetti et al. 2007).

In der vorliegenden Arbeit konnte unter basalen Bedingungen in der Iso-Gruppe eine signifikant beschleunigte Geschwindigkeit der Verkürzung, sowie des

maximalen Kalziumanstiegs gegenüber der Kontrollgruppe aufgezeichnet werden. Jedoch war die Zeit zum Erreichen der maximalen Kontraktion und die Zeit zum maximalen Kalziumanstieg in beiden Gruppen basal gleich. Das abweichende Ergebnis der vorliegenden Arbeit kann unter anderem darin begründet liegen, dass die Versuche an Kardiomyozyten durchgeführt wurden, welche isoliert von der extrazellulären Matrix in der Suspensionslösung gelöst waren. Die Kardiomyozyten waren somit in keinem Muskelverbund und daher nicht vorgedehnt und haben isotonisch kontrahiert.

Nach Zugabe von NCA kommt es zu einer gleichen maximalen Beschleunigung der Geschwindigkeit der Verkürzung sowie des Kalziumanstiegs. Die Zeit bis zum Erreichen der maximalen Kontraktion blieb jedoch nach NCA-Gabe in beiden Gruppen gleich. Eine Erklärung dafür ist, dass trotz erhöhter Geschwindigkeit der Verkürzung gleichzeitig auch ein längerer Weg bis zum Erreichen der maximalen Kontraktion unter NCA-Einfluss zurückgelegt werden muss, da es zu einem Anstieg der Kontraktion unter NCA kommt. Die Zeit bis zum Erreichen des Kontraktionsmaximums bleibt daher insgesamt unverändert.

Die Zeit bis zum Erreichen der maximalen Kalziumabgabe verlängert sich hingegen nach NCA-Applikation in beiden Gruppen gegenüber den basalen Ausgangsbedingungen. Auch bei Tocchetti et al. (2007) zeigte sich eine verlängerte Zeitspanne zum Erreichen der maximalen Kalziumtransienten sowohl in den isolierten Kardiomyozyten der Maus als auch in der Ratte. Nach NCA Zugabe kommt es zu einer Erhöhung der Kalziumtransienten folglich muss ein längerer Weg zurückgelegt werden bis zum Erreichen der maximalen Kalziumtransienten. Dies würde die verlängerte Zeit unter NCA Einfluss erklären. Die beschleunigte Geschwindigkeit unter NCA Wirkung reicht nicht dazu aus, diesen längeren Weg auszugleichen. Dies kann daran liegen, dass der Kalziumchelator Fura-2 einen Teil der intrazellulären Kalziumionen abfängt, welche freigesetzt werden und in Folge die gemessenen Parameter beeinflusst. Fura-2 wurde 1985 von Grynkiewicz et al. entwickelt und ist ein ausgezeichneter Farbstoff, welcher selektiv Kalziumionen bindet und einen Komplex bildet, der schnell genug ist, um die Kalziumtransienten der schlagenden Zelle darzu-

stellen. Tocchetti et al. (2007) verwendeten den Kalzium Indikator Flou-4, welcher auch einen Kalziumchelator darstellt und die veränderten Parameter ausgelöst haben kann.

Obwohl die Messungen an isolierten Myozyten nicht die *in vivo* Konditionen komplett nachahmen können und zum Teil für abweichende Bedingungen verantwortlich sind, können sie dennoch die Eigenschaften der Myozyten verdeutlichen, welche durch Zellen im Verband verschleiert werden würden. Die oben genannten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine nach dem Isolationsvorgang bestehende intakte Zellfunktion, sei es im Hinblick auf die basale Kontraktion oder die Veränderung der Kontraktilität durch cAMP-abhängige (Isoprenalin) und cAMP-unabhängige (NCA und AS) Stimulation. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Einzelzellmethode ein valides System ist, um die Kardiomyozytenfunktion zu untersuchen.

#### **4.4 Wirkung von NCA auf das Sarkoplasmatische Retikulum**

Eine Substanz wie HNO, die mit einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumzirkulation einhergeht, gibt normalerweise Anlass zu Bedenken, denn es birgt die Gefahr einer möglichen elektrischen Instabilität und die Entwicklung von Arrhythmien. Diese gehen entweder aus einem hohen diastolischen Kalziumgehalt hervor, welcher über eine Aktivierung des elektrogenen  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers zur Depolarisation der Zelle oder aus einer Kalzium-Überladung des SR, welche einen Leak verursachen und zu einer diastolischen Kalziumabgabe über sensibilisierte RYR2 führen können (Bers et al. 2002 und Shannon et al. 2002).

In einer weiteren Versuchsreihe wurde deshalb geprüft, ob eine solche elektrische Instabilität durch das vom NCA freigesetzte HNO entstehen könnte. Dazu erfolgte neben der Hinzugabe von NCA eine zusätzliche Applikation von Koffein auf die mit Fura-2 AM beladenen, isolierten Kardiomyozyten. Über eine direkte Aktivierung der RyR erfolgte dann die Entleerung des gesamten sarkoplasmatischen Kalziumgehaltes. Die Methode der Entladung des SR mittels Koffein wurde in der Vergangenheit schon öfters in Experimenten angewandt

(Bassani et al. 1995 und Rasmussen et al. 1987).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit verdeutlichen, dass NCA zu einer Erhöhung der Kontraktilität führt, ohne eine nachteilige Steigerung der diastolischen Kalziumkonzentration zu bewirken (siehe Abb. 3.9 A). Zudem geht es auch mit keiner Erhöhung des Kalziumgehaltes des SR einher (siehe Abb. 3.14 B). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass HNO vermutlich kein arrhythmogenes Potenzial besitzt. Von großer Bedeutung ist dies im Hinblick auf einen möglichen Einsatz von HNO in der Therapie der Herzinsuffizienz. Die NCA vermittelte Veränderung des Kalziumumsatzes ist übereinstimmend mit den Daten, die unter ähnlichen experimentellen Bedingungen, allerdings mit dem HNO-Donator AS, durchgeführt worden sind (Dai et al. 2007, Tocchetti et al. 2007, Lancel et al. 2009, Choeng et al. 2005 und Freohlich et al. 2008).

Weitere Ergebnisse zeigen, dass der gesteigerte Kalziumtransient unter NCA durch eine gesteigerte sarkoplasmatische Kalziumabgabefraktion verursacht wird (siehe Abb. 3.14 A). Die gesteigerte Kalziumabgabe mit dabei unverändertem Kalziumgehalt des SR und gleichbleibender diastolischer Kalziumkonzentration lässt vermuten, dass HNO eher modifizierend auf die Ryanodin Rezeptorfunktion wirkt, als einen Leck zu verursachen. Zudem stellt die Studie von Kohr et al. (2010) dar, dass die positive Inotropie von HNO nur durch die Kalziumabgabe aus dem SR hervorgerufen wird, ohne dabei extrazelluläres Kalzium über die L-Typ Kanäle zu beziehen. Diese Wirkungen unterscheiden sich von den Effekten, welche durch NO-Donatoren,  $\beta$ -Agonisten und Koffein vermittelt werden. Während die NO-Donatoren keinen Einfluss auf die Kalziumabgaberate haben, stimulieren  $\beta$ -Agonisten die RYR2 Offenwahrscheinlichkeit mittels PKA-Phosphorylierung und führen außerdem über eine Phosphorylierung von PLB zu einem erhöhten SR Kalziumgehalt. Koffein indessen führt zu einer abrupten Kalziumabgabe, sowie zu einer Verminderung der sarkoplasmatischen Beladung. Das vom Donator NCA freigesetzte HNO hingegen führt zu einem Anstieg des Kalziumtransienten und zu einer anhaltend gesteigerten Inotropie (Abb. 3.10 B und Abb. 3.6 A). Dies lässt vermuten, dass das SR durchgehend über eine Beschleunigung des Kalzium-Rückflusses mit Kalzium aufge-

füllt wird (Abb. 3.11 D und 3.12 D). Vermutlich resultiert dies aus einer direkten Aktivierung der SERCA (Lancel et al. 2009) oder aus einer Modulation von PLB (Froehlich et al. 2008). Dabei scheint die Einzigartigkeit der HNO-Wirkung durch die Reaktivität mit Thiolgruppen oder -resten bedingt zu sein (Flores-Santana et al. 2011, Switzer et al. 2009, Fukuto et al. 2008). Zur Aufrechterhaltung der positiven Inotropie ist es wichtig, einen erhöhten, bzw. gleich bleibenden Kalziumrückfluss in das SR während der Relaxation zu haben, da genau dieser Prozess in insuffizienten Herzen verlangsamt zu sein scheint. Bestrebungen dies durch Genmodulation zu stimulieren, beispielsweise via Manipulation von PLB oder Erhöhung der SERCA2a Expression, unterstreichen die therapeutische Attraktivität dieses Angriffsziels (Tocchetti et al. 2007).

#### **4.5 Klinische Relevanz und Ausblick**

In der Herzinsuffizienzforschung bildet die Untersuchung der Modulation der Kontraktilität des Herzen mittels Medikamenten einen wichtigen Schwerpunkt, denn die Therapiealternativen (z.B. Transplantation) sind sehr gering. Die Behandlung der Herzinsuffizienz ist zudem sehr komplex: zum einen liegt eine  $\beta$ -adrenerge Desensibilisierung vor, was eigentlich einen protektiven Mechanismus darstellt, zum anderen geht die Verwendung von inotropen Pharmaka in der Langzeitbehandlung mit einer erhöhten Mortalität und einer geringen Wirksamkeit einher. Jedoch ist auch zu betonen, dass die  $\beta$ -adrenerge Desensibilisierung eine Schattenseite hat. Sei es die reduzierte Belastungstoleranz, die reduzierte Relaxationsgeschwindigkeit oder der geminderte Kalziumumsatz des SR. Somit ergibt sich als zentrale Frage, ob diese Probleme unter Umgehung des  $\beta$ -adrenen/cAMP-Systems zielorientiert therapiert werden können.

Zusammenfassend aus den vorliegenden Ergebnissen haben wir zum ersten Mal demonstriert, dass HNO freigesetzt aus NCA eine positive Inotropie über die Erhöhung der Kalziumzirkulation des SR und der Myofilamentsensitivierung in normalen, sowie in chronisch  $\beta$ -adrenerg desensibilisierten Kardiomyozyten induziert. Von großer Bedeutung ist dabei der cAMP- und damit vom  $\beta$ -Rezeptor unabhängige Wirkungsweg. Zudem bleibt unter NCA-Einfluss die diasto-

lische Kalziumkonzentration und der Gesamtkalziumgehalt des SR gleich. NCA bewirkt auch eine beschleunigte Relaxation in den  $\beta$ -adrenerg desensibilisierten Kardiomyozyten. Dieser Prozess ist vor allem in insuffizienten Herzen verlangsamt und stellt ein wichtiges therapeutisches Zielgebiet dar. Mechanistisch scheinen die Wirkungen mit denen von dem gut erforschten HNO-Donator *Angeli's Salz* identisch zu sein, obwohl die Effekte von NCA bemerkenswerterweise unter viel niedrigeren Konzentrationen eintreten.

Vor allem die Kombination aus positiver Inotropie mit beschleunigter Auswurfleistung des Herzen und gleichzeitiger Vasodilatation könnte in der Therapie einer akuten Herzinsuffizienz von großer Bedeutung sein. Die aktuelle Leitlinie der europäischen Gesellschaft für Kardiologie empfiehlt bei einer akuten Dekompensation die Herzfunktion via  $\beta$ -Agonisten zu unterstützen und den Druck durch die Gabe von Vasodilatoren wie Nitroglyzerin zu senken, um somit das Herz zu entlasten (ESC-European Heart Clinical Practice Guidelines 2008). Interessanterweise zeigt HNO in diesem Zusammenhang beide Effekte gemeinsam. Im Gegensatz zu den  $\beta$ -Agonisten zeigt HNO auch keine reduzierte Wirksamkeit, da es unabhängig von der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade wirkt.

Auch in der Therapie der chronischen Herzinsuffizienz bietet HNO das Potenzial als Medikament zur Behandlung der Herzinsuffizienz in Betracht gezogen zu werden. Pharmaka, welche die neuroendokrine Aktivierung abschwächen, können bei einer Herzinsuffizienz zwar die Umbauvorgänge des Herzen reduzieren oder rückgängig machen, das Fortschreiten der Herzinsuffizienz kann aber nicht verhindert werden. Aus diesem Grund ist es besonders wertvoll neben dem Konzept der neurohumoralen Aktivierung auch andere Schwerpunkte zu finden. Vor allem die linksventrikuläre Dysfunktion könnte ein neues Therapieziel sein, um die frühe Progression der Herzinsuffizienz zu verhindern und um überhaupt das Einsetzen des neuroendokrinen Kreislaufs zu verhindern. Dies könnte durch die positiv inotrope Wirkung von HNO ermöglicht werden, welche unabhängig vom Preload ist (Paolucci et al. 2003) und sowohl auf normale als auch auf desensibilisierte Kardiomyozyten und Herzen eine gleichartig positiv inotrope Wirkung zeigt (Abb. 3.5 und Paolucci et al. 2003).

Daher legen diese Daten nahe, dass NCA ein zukünftiges therapeutisches Potenzial besitzt, als neuer HNO-Donator eingesetzt zu werden, unter anderem hinsichtlich des überlegenen pharmakokinetischen Profils die kontraktile Dysfunktion zu behandeln. Dies gilt besonders in Anbetracht der Ergebnisse, welche die Effizienz von *Angeli's Salz* in intakten großen Tieren mit Herzinsuffizienz zeigten (Paolucci et al. 2003). In der Therapie der Herzinsuffizienz hat sich das Prinzip der neurohumoralen Blockade unter anderem durch den Einsatz von  $\beta$ -Blockern etabliert. Die Beobachtung, dass HNO die Effektivität von  $\beta$ -Blockern nicht beeinflusst, bietet zudem die Möglichkeit der Verwendung von HNO als Ergänzung zu den bisherigen Therapieansätzen.

Es stellt sich natürlich die Frage inwieweit die Versuchsergebnisse tatsächlich auf den Gesamtorganismus des Menschen übertragbar sind, deshalb werden künftige Studien benötigt, welche die Antwort von NCA *in vivo* und in der Langzeitbehandlung ermitteln, um die Wirksamkeit und Sicherheit von NCA in der Behandlung von Herzerkrankungen zu ermitteln. Die hier erbrachten Ergebnisse bieten einen wichtigen und wertvollen Startpunkt um NCA weiter zu verfolgen und zu erforschen.



## 5. Zusammenfassung

Kontraktile Dysfunktion und eine reduzierte Antwort auf  $\beta$ -adrenerge Stimulation sind charakteristisch für die Herzinsuffizienz. Vor allem Medikamente zur risikoarmen Verbesserung der Herzfunktion werden derzeit benötigt. Nitroxyl (HNO) verbessert die Kontraktilität in insuffizienten Herzen und stellt einen attraktiven Kandidaten für die medikamentöse Behandlung von Herzerkrankungen dar. Aufgrund der hohen Reaktionsfreudigkeit von HNO wird in experimentellen Studien auf HNO-Donatoren zurückgegriffen. Unterschiedliche HNO-Donatoren wurden bisher erforscht, darunter auch das häufig verwendete AS, welches jedoch in biologischen Systemen Limitationen aufweist. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob der pure und lang anhaltende HNO-Donator 1-Nitrosocyclohexyl Acetat (NCA) eine positive Inotropie in normalen und in hypertrophierten ventrikulären Kardiomyozyten induziert.

Dabei wurden die Kardiomyozyten aus Mausherzen isoliert, welche *in vivo* über einen Zeitraum von 5 Tagen entweder mit einer pathologischen Isoprenalin-Infusion (Iso; 30  $\mu\text{g/g}$  pro Tag) oder einer 0,9% NaCl-Infusion (Kontrollen) behandelt wurden. Sarkomerlängenveränderung und Kalziumtransienten wurden simultan mit Hilfe des IonOptix Systems in Gegenwart von Fura-2 AM gemessen. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass es unter NCA Einfluss konzentrationsabhängig zu einer Kontraktilitätszunahme um +40-200% ( $\text{EC}_{50} \sim 55\mu\text{M}$ ) kam. Dabei erfolgte der Anstieg zu einem gleichen Ausmaß sowohl in den gesunden als auch in den hypertrophierten Kardiomyozyten. Hingegen bewirkte eine akute Isoprenalin-Applikation (ISO 1  $\mu\text{M}$ ) eine abgeschwächte Inotropiesteigerung in den chronisch  $\beta$ -adrenerg stimulierten und hypertrophierten Kardiomyozyten. Eine Konzentration von 60  $\mu\text{M}$  NCA, nahe der  $\text{EC}_{50}$ , steigerte die Sarkomerlängenverkürzung (um 250%) circa zweifach stärker, als die intrazellulären Kalziumtransienten (um 120%), was neben der Erhöhung des Kalziumumsatzes im SR auf eine Kalzium-Sensitivierung der Myofilamente hindeutet. Bedeutender Weise kommt es unter NCA zu keiner nachteiligen Veränderung der diastolischen Kalziumkonzentration oder des Gesamtkalziumgehaltes im SR, was auf ein geringes Arrhythmiepotenzial der Substanz schließen lässt. Abschließend

zeigt die vorliegende Arbeit, dass die Freigabe von HNO aus NCA eine starke Zunahme der Inotropie in normalen und  $\beta$ -adrenerg desensibilisierten ventrikulären Myozyten hervorgerufen hat. Diese Wirkungen legen nahe, dass NCA das Potenzial hat, als neuer HNO-Donator eingesetzt zu werden. Die Arbeit dient somit als Grundlage für die weitere Überprüfung des Donators NCA in anschließenden *in vivo* Experimenten, um die Effizienz und Sicherheit von NCA in der Therapie der Herzinsuffizienz zu erforschen.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

### Vorsätze für SI-Einheiten

<b>k</b>	Kilo ( $10^3$ )
<b>m</b>	Milli ( $10^{-3}$ )
<b>μ</b>	Mikro ( $10^{-6}$ )
<b>n</b>	Nano ( $10^{-9}$ )
<b>p</b>	Pico ( $10^{-12}$ )
<b>f</b>	Femto ( $10^{-15}$ )
<b>%</b>	Prozent
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>β-AR</b>	β-Adrenozeptor
<b>ADP</b>	Adenosindiphosphat
<b>Angeli's Salz</b>	$\text{Na}_2\text{N}_2\text{O}_3$ (Donator)
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>BDM</b>	2,3-butandion monoxim
<b>BW</b>	Körpergewicht
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcium
<b>cAMP</b>	zyklisches Adenosinmonophosphat
<b>cGMP</b>	zyklisches Guanosinmonophosphat
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxid
<b>DHPR</b>	Dihydropyridinrezeptor
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DTPA</b>	Diethylentriaminpentaessigsäure
<b>EC<sub>50</sub></b>	Mittlere effektive Konzentration
<b>EDC</b>	Excitation Dichronic Cube
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>EF</b>	Ejektionsfraktion
<b>EKG</b>	Elektrokardiogramm
<b>F340/380</b>	Floureszenzintensitätenverhältnis bei 340 und 380

	nm Wellenlänge
<b>FAS</b>	Linksventrikuläre Flächenverkürzungsfraction
<b>Fura-2 AM</b>	Fura-2-Acetoxymethyl-(AM)-Ester
<b>g</b>	Erdbeschleunigung (9,8 m/s <sup>2</sup> )
<b>g</b>	Gramm
<b>GDP</b>	Guanosindiphosphat
<b>Gs</b>	stimuliertes G-Protein
<b>GTP</b>	Guanosintriphosphat
<b>h</b>	Stunde
<b>HEPES</b>	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
<b>HF</b>	Herzfrequenz
<b>HNO</b>	Nitroxyl
<b>HW</b>	Herzgewicht
<b>HWZ</b>	Halbwertszeit
<b>Hz</b>	Hertz
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>ISO</b>	Isoprenalin
<b>Iso-Gruppe</b>	Mit einer 5- tändigen Isoprenalin-Infusion behandelte Gruppe
<b>IU</b>	<i>international unit</i> , internationale Einheit
<b>K<sub>v</sub></b>	Kaliumkanal
<b>l</b>	Liter
<b>LVM</b>	Masse des linken Ventrikels
<b>M</b>	Molar
<b>M</b>	Masse
<b>m</b>	Meter
<b>min</b>	Minuten
<b>Mio</b>	Millionen
<b>MW</b>	Molekülmasse
<b>N</b>	Newton
<b>NCA</b>	1-Nitrosocyclohexyl-Acetat (HNO Donator)
<b>NCX</b>	Natrium-Kalzium-Austauscher

<b>NO</b>	<i>nitric oxide</i> , Stickstoffmonoxid
<b>NOS</b>	NO-Synthase
<b>n.s.</b>	nicht signifikant
<b>O<sub>2</sub></b>	Sauerstoff
<b>P</b>	Phosphor
<b>PDE</b>	Phosphodiesterase
<b>PLB</b>	Phospholamban
<b>pKa</b>	Säurekonstante
<b>PKC</b>	Proteinkinase C
<b>PKG</b>	Proteinkinase G
<b>PMT</b>	Photo Multiplier Tube
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>RyR2</b>	Ryanodinrezeptor Typ 2
<b>s</b>	Sekunden
<b>SEM</b>	<i>Standard Error of the Mean</i> , Standardfehler
<b>SERCA2a</b>	Sarkoendoplasmatisches-Retikulum-Kalzium-ATPase 2a
<b>sGC</b>	<i>soluble guanylate cyclase</i> , lösliche Guanylatzyklase
<b>SR</b>	Sarkoplasmatisches Retikulum
<b>t</b>	Zeit
<b>TnC</b>	Troponin C
<b>TnI</b>	Troponin I
<b>TnT</b>	Troponin T
<b>UK</b>	United Kingdom
<b>USA</b>	United States of America
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>V</b>	Volt
<b>W</b>	Watt
<b>z. B.</b>	zum Beispiel

## 7. Literaturverzeichnis

**Bartel S**, Stein B, Eschenhagen T, Mende U, Neumann J, Schmitz W, Krause EG, Karczewski P, Scholz H. Protein phosphorylation in isolated trabeculae from nonfailing and failing human hearts. *Mol Cell Biochem.* 1996; 157:171-179.

**Bassani JWM**, Yuan W, Bers DM. Fractional calcium release is regulated by trigger calcium and SR calcium content in cardiac myocytes. *Am J Physiol.* 1995, 268:1313 -1329.

**Behrends JC**, Bischofsberger J, Deutzmann R, Kurtz A, Wagner C, Hoth M, Rettig J, Leipziger J, Müller F, Pedain C, Wischmeyer E, Ehmke H, Frings S, Grissmer S (2010) Duale Reihe Physiologie, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, S. 57-64; 73-104.

**Bermejo E**, Sáenz DA, Alberto F, Rosenstein RE, Bari SE, Lazzari MA. Effect of nitroxyl on human platelets function. *Thromb Haemost.* 2005; 94:578-584.

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

**Bers DM**. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol.* 2008; 70:23-49.

**Bodor GS**, Oakeley AE, Allen PD, Crimmins DL, Ladenson JH, Anderson PA. Troponin I phosphorylation in the normal and failing adult human heart. *Circulation.* 1997; 96:1495-1500.

**Böhm M**, Beuckelmann D, Brown L, Feiler G, Lorenz B, Näbauer M, Kemkes B, Erdmann E. Reduction of beta-adrenoceptor density and evaluation of positive inotropic responses in isolated diseased human myocardium. *Eur Heart J.* 1988; 9:844-852.

**Bristow MR**, Ginsburg WA, Minobe WQ, Cubicciotti RS, Sagemann WS, Lurie K, Billingham ME, Harrison DC, Stinson EB. Decreased catecholamine sensitivity and  $\beta$ -adrenergic receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med.* 1982; 307: 205 -211.

**Bristow MR**, Ginsburg WA, Umans V, Fowler M, Minobe WA, Rasmussen R, Zera P, Menlove R, Shah P, Jamieson S, Stinson EB.  $\beta$ 1- and  $\beta$ 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective  $\beta$ 1-receptor down-regulation in heart failure. *Circ Res.* 1986; 59:297-309.

**Bristow MR**. Beta-adrenergic receptor blockade in chronic heart failure. *Circulation.* 2000; 101:558-569.

**Bullen ML**, Miller AA, Dharmarajah J, Drummond GR, Sobey CG, Kemp-Harper BK. Vasorelaxant and antiaggregatory actions of the nitroxyl donor isopropylamine NONOate are maintained in hypercholesterolemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011; 301:1405-1414.

**Cheong E**, Tumbiev V, Abramson J, Salama G, Stoyanovsky DA. Nitroxyl triggers  $Ca^{2+}$  release from skeletal and cardiac sarcoplasmic reticulum by oxidizing ryanodine receptors. *Cell Calcium*. 2005; 37:87-96.

**Cleland JG**, Daubert JC, Erdmann E, Freemantle N, Gras D, Kappenberger L, Tavazzi L. The effect of cardiac resynchronisation on morbidity and mortality in heart failure. *N Engl J Med*. 2005; 352:1539-1549.

**Colucci WS**, Denniss AR, Leatherman GF, Quigg RJ, Ludmer PL, Marsh JD, Gauthier DF. Intracoronary infusion of dobutamine to patients with and without severe congestive heart failure. Dose-response relationships, correlation with circulating catecholamines, and effect of phosphodiesterase inhibition. *J Clin Invest*. 1988; 81:1103-1110.

**Dai T**, Tian Y, Tocchetti CG, Katori T, Murphy AM, Kass DA, Paolocci N, Gao WD. Nitroxyl increases force development in rat cardiac muscle. *J Physiol*. 2007; 580:951-960.

**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; 40:1056-1066.

**El-Armouche A**, Eschenhagen T. Beta-adrenergic stimulation and myocardial function in the failing heart. *Heart Fail Rev*. 2009; 14:225-241.

**Engelhardt S**, Böhm M, Erdmann E, Lohse MJ. Analysis of beta-adrenergic receptor mRNA levels in human ventricular biopsy specimens by quantitative polymerase chain reactions: progressive reduction of beta 1-adrenergic receptor mRNA in heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 1996; 27:146-154.

**ESC-European Heart Clinical Practice Guidelines 2008** [Online im Internet]  
URL:<http://www.escardio.org/guidelines-surveys/esc-guidelines/GuidelinesDocuments/guidelines-HF-EJHF.pdf> [Stand: 15.04.2012, 23:15]

**Favaloro JL**, Kemp-Harper BK. Redox variants of NO (NO{middle dot} and HNO) elicit vasorelaxation of resistance arteries via distinct mechanisms *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009; 296:1274-1280.

**Flores-Santana** W, Salmon DJ, Donzelli S, Switzer CH, Basudhar D, Ridnour L, Cheng R, Glynn SA, Paolucci N, Fukuto JM, Miranda KM, Wink DA. The specificity of nitroxyl chemistry is unique among nitrogen oxides in biological systems. *Antioxid Redox Signal*. 2011; 14:1659-1674.

**Froehlich** JP, Mahaney JE, Keceli G, Pavlos CM, Goldstein R, Redwood AJ, Sumbilla C, Lee DI, Tocchetti CG, Kass DA, Paolucci N, Toscano JP. Phospholamban thiols play a central role in activation of the cardiac muscle sarcoplasmic reticulum calcium pump by nitroxyl. *Biochemistry* 2008; 47:13150-13152.

**Fukuto** JM, Chiang K, Hszieh R, Wong P, Chaudhuri G. The pharmacological activity of nitroxyl (HNO): a potent vasodilator with activity similar to nitric oxide and/ or endothelium- derived relaxing factor. *J Pharmacol Exp Ther*. 1992; 263:546-551.

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

**Gladwin** MT, Schechter AN, Kim-Shapiro DB, Patel RP, Hogg N, Shiva S, Cannon RO 3rd, Kelm M, Wink DA, Espey MG, Oldfield EH, Pluta RM, Freeman BA, Lancaster JR Jr, Feelisch M, Lundberg JO. The emerging biology of the nitrite anion. *Nat Chem Biol*. 2005; 1:308-314.

**Goldhaber** JI, Hamilton MA. Role of inotropic agents in the treatment of heart failure. *Circulation*. 2010; 121:1655-1660.

**Grynkiewicz** G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*. 1985; 260:3440-3450.

**Hall** SA, Cigarroa CG, Marcoux L, Risser RC, Grayburn PA, Eichhorn EJ. Time course of improvement in left ventricular function, mass and geometry in patients with congestive heart failure treated with beta- adrenergic blockade. *J Am Coll Cardiol*. 1995; 25:1154-1161.

**Hasenfuss** G, Reinicke H, Studer R, Meyer M, Pieske B, Holtz J, Holubarsch C, Posival H, Just H, Drexler H. Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Calcium-ATPase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res*. 1994; 75:434 -442.

**Hasenfuss** G. and Teerlink J.R. Cardiac inotropes: current agents and future directions. *European Heart Journal* 2011; 32:1838-1845.

**Holubarsch** C, Hasenfuss G, Schmidt-Schweda S, Knorr A, Pieske B, Ruf T, Fasol R, Just H. Angiotensin I and II exert inotropic effects in atrial but not in ventricular human myocardium: An in vitro study under physiological experimental conditions. *Circulation*. 1993; 88:1228 -1237.



**Houser** SR, Margulies KB. Is depressed myocyte contractility centrally involved in heart failure? *Circ Res.* 2003; 92:350-358.

**Irvine** JC, Favalaro JL, Kemp-Harper BK. NO- activates soluble guanylate cyclase and Kv channels to vasodilate resistance arteries. *Hypertension.* 2003 41:1301-1307.

**Irvine** JC, Favalaro JL, Widdop RE, Kemp-Harper BK. Nitroxyl anion donor, Angeli's salt, does not develop tolerance in rat isolated aortae. *Hypertension.* 2007; 49:885-892.

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

**Kaye** DM, Lefkovits J, Jennings GL, Bergin P, Broughton A, Esler MD. Adverse consequences of high sympathetic nervous activity in the failing human heart. *J AM Coll Cardiol* 1995; 26:1257-1263.

**Kiss** E, Ball NA, Kranias EG, Walsh RA. Differential changes in cardiac phospholamban and sarcoplasmic reticular Ca<sup>2+</sup>-ATPase protein levels. Effects on Ca<sup>2+</sup> transport and mechanics in compensated pressure-overload hypertrophy and congestive heart failure. *Circ Res.* 1995; 77:759-764.

**Kohr** MJ, Kaludercic N, Tocchetti CG, Dong Gao W, Kass DA, Janssen PM, Paolucci N, Ziolo MT. Nitroxyl enhances myocyte Ca<sup>2+</sup> transients by exclusively targeting SR Ca<sup>2+</sup>-cycling. *Front Biosci (Elite Ed)* 2010; 2:614-626.

**Lancel** S, Zhang J, Evangelista A, Trucillo MP, Tong X, Siwik DA, Cohen RA, Colucci WS. Nitroxyl activates SERCA in cardiac myocytes via glutathiolation of cysteine 674. *Circ Res.* 2009; 104:720-723.

**Lechat** P, Escolano S, Golmard JL, Lardoux H, Witchitz S, Henneman JA, Maisch B, Hetzel M, Jaillon P, Boissel J-P, Mallet A. Prognostic value of bisoprolol- induced hemodynamic effects in heart failure during the Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study (CIBIS). *Circulation.* 1997; 96:2197-2205.

**Leitlinien Herzinsuffizienz DGK** [Online im Internet]

URL:[http://leitlinien.dgk.org/images/pdf/leitlinien\\_volltext/2008-13\\_kommentar.pdf](http://leitlinien.dgk.org/images/pdf/leitlinien_volltext/2008-13_kommentar.pdf) [Stand: 16.04.2012, 7:00]

**Linck** B, Bokník P, Baba HA, Eschenhagen T, Haverkamp U, Jäckel E, Jones LR, Kirchhefer U, Knapp J, Lärer S, Müller FU, Schmitz W, Scholz H, Syska A, Vahlensieck U, Neumann J. Long-term beta adrenoceptor-mediated alteration in contractility and expression of phospholamban and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase in mammalian ventricle. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998; 286:531-538.

**Lohse MJ**, Engelhardt S, Eschenhagen T. What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? *Circ Res*. 2003; 93:896-906.

**Lopez BE**, Shinyashiki M, Han TH, Fukuto JM. Antioxidant actions of nitroxyl (HNO). *Free Radic Biol Med*. 2007 Feb; 42:482-491.

**Massion PB**, Pelat M, Belge C, Balligand JL. Regulation of the mammalian heart function by nitric oxide. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2005; 142:144-150.

**Mende U**, Eschenhagen T, Geertz B, Schmitz W, Scholz H, Schulte am Esch J, Sempell R, Steinfath M. Isoprenaline-induced increase in the 40/41 kDa pertussis toxin substrates and functional consequences on contractile response in rat heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1992; 345:44-50.

**Meyer M**, Schillinger W, Pieske B, Holubarsch C, Heilmann H, Posival H, Kuwajima G, Mikoshiba K, Just H, Hasenfuss G. Alterations of sarcoplasmic reticulum proteins in failing human dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 1995; 92:778 -784.

**Mudd JO**, Kass DA. Reversing chronic remodeling in heart failure. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2007; 5:585-598.

**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> [Stand: 15.04.2012, 15:40]

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

**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 redoxsensitive positive cardiac inotropy in vivo by calcitonin gene-related peptide signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98:10463-10468.

**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<sup>-</sup> in failing hearts: independence from beta-adrenergic signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100:5537-5542.

**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; 113:442-458.

**Pogwizd** SM, Schlotthauer K, Li L, Yuan W, Bers DM. Sodium-calcium exchange contributes to mechanical dysfunction and triggered arrhythmias in heart failure. *Circ Res.* 2001; 88:1159-1167.

**Rasmussen** CA Jr, Sutko JL, Barry WH. Effects of ryanodine and caffeine on contractility, membrane voltage, and calcium exchange in cultured heart cells. *Circ Res.* 1987; 60:495-504.

**Rau** T, Heide R, Bergmann K, Wuttke H, Werner U, Feifel N, Eschenhagen T. Effect of the CYP2D6 genotype in metoprolol metabolism persists during long-term treatment. *Pharmacogenetics* 2002; 12:465-472.

**Satwani** S, Dec GW, Narula J. Beta- adrenergic blockers in heart failure: review of mechanisms of action and clinical outcomes. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2004; 9:243-255.

**Schwinger** RH, Münch G, Bölcck B, Karczewski P, Krause EG, Erdmann E. Reduced Ca<sup>2+</sup>- sensitivity of SERCA 2a in failing human myocardium due to reduced serin-16 phospholamban phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol.* 1999; 31:479-491.

**Sha** X, Isbell TS, Patel RP, Day CS, King SB. Hydrolysis of acyloxy nitroso compounds yields nitroxyl (HNO). *J Am Chem Soc.* 2006; 128:9687-9692.

**Shannon** TR, Ginsburg KS, Bers DM. Quantitative assessment of the SR Ca<sup>2+</sup> leak-load relationship. *Circ Res.* 2002; 91:594-600.

**Statistisches Bundesamt 2010** [Online im Internet]

URL:<https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/SterbefaelleInsgesamt.html?nn=50808>

[Stand: 15.04.2012, 22:00]

**Switzer** CH, Flores-Santana W, Mancardi D, Donzelli S, Basudhar D, Ridnour LA, Miranda KM, Fukuto JM, Paolocci N, Wink DA. The emergence of nitroxyl (HNO) as a pharmacological agent. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1787:835-840.

**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<sup>2+</sup> cycling. *Circ Res.* 2007; 100:96-104.

**Tocchetti** CG, Stanley BA, Murray CI, Sivakumaran V, Donzelli S, Mancardi D, Pagliaro P, Gao WD, van Eyk J, Kass DA, Wink DA, Paolocci N. Playing with cardiac "redox switches": the "HNO way" to modulate cardiac function. *Antioxid Redox Signal* 2011; 14:1687-1698.

**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; 285:2264-2276.

**Wittköpper** K, Fabritz L, Neef S, Ort KR, Grefe C, Unsöld B, Kirchhof P, Maier LS, Hasenfuss G, Dobrev D, Eschenhagen T, El-Armouche A. Constitutively active phosphatase inhibitor-1 improves cardiac contractility in young mice but is deleterious after catecholaminergic stress and with aging. *J Clin Invest.* 2010; 120:617-626.

## **8. Lebenslauf**

<b>Name</b>	Azadeh Wahab
<b>Geburtsdatum</b>	21.05.1985
<b>Geburtsort</b>	Herat (Afghanistan)

### **Schul Ausbildung**

1992 – 1996	Grundschule Jenfelder Straße Hamburg
1996 – 2005	Matthias Claudius Gymnasium Hamburg

### **Hochschulausbildung**

2005 – 2011	Studium der Humanmedizin (Universität Hamburg)
12/2011	Ärztliche Prüfung

### **Promotion**

Seit 01/2009	Beginn der Promotion im Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
--------------	---

## 9. Veröffentlichungen

### Originalarbeiten

El-Armouche A, **Wahab A**, Wittköpper K, Schulze T, Böttcher F, Pohlmann L, King SB, DuMond JF, Gerloff C, Böger RH, Eschenhagen T, Carrier L, Donzelli S. The new HNO donor, 1-nitrosocyclohexyl acetate, increases contractile force in normal and  $\beta$ -adrenergically desensitized ventricular myocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 402:340-344.

Andrei D, Salmon DJ, Donzelli S, **Wahab A**, Klose JR, Citro ML, Saavedra JE, Wink DA, Miranda KM, Keefer LK. Dual mechanisms of HNO generation by a nitroxyl prodrug of the diazeniumdiolate (NONOate) class. *J Am Chem Soc.* 2010; 132:16526-16532.

Biermann D, Heilmann A, Didié M, Schlossarek S, **Wahab A**, Grimm M, Römer M, Reichenspurner H, Sultan KR, Steenpass A, Ergün S, Donzelli S, Carrier L, Ehmke H, Zimmermann WH, Hein L, Böger RH, Benndorf RA. Impact of AT2 Receptor Deficiency on Postnatal Cardiovascular Development. *PLoS One.* 2012; 7:e47916.

## **10. Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. Böger für die die Vergabe der Promotionsarbeit sowie die Aufnahme in seinen Arbeitsbereich und die stets hilfreiche und umfassende Art der Betreuung.

Herrn Prof. Dr. T. Eschenhagen und Frau Dr. L. Carrier danke ich für die zahlreichen Anregungen, die wertvollen Ratschläge und fruchtbaren Diskussionen, wodurch ein sehr produktives Arbeitsklima entstand.

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 Prof Dr. Ali El-Armouche und Dr. Katrin Wittköpper danke ich für die fruchtbare Kollaboration, die vielen Aufmunterungen sowie die Unterstützung bei der Ausarbeitung der Promotion.

Herrn Dr. Felix Böttcher und Frau Lisa Krämer danke ich für die großartige Unterstützung bei der Einarbeitung. Mein großer Dank gilt Herrn Thomas Schulz und Frau Birgit Geertz für die Durchführung zahlreicher Echokardiographien und die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Weiterhin möchte ich allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des Instituts für ihre kollegiale Zusammenarbeit, die ständige Hilfsbereitschaft und den freundlichen Umgang danken.

Mein aufrichtigster Dank gilt meinen Eltern, die mir meinen bisherigen Lebensweg ermöglicht haben und mich uneingeschränkt unterstützt haben. Außerdem meinen beiden Brüdern Edris und Tamim, die mir jederzeit zur Seite standen.

## **11. Eidesstattliche Erklärung**

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: .....