

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. Georg Ertl

**Einfluss der pharmakologischen Langzeittherapie mit dem sGC-Aktivator
Ataciguat auf die Endotheliale Dysfunktion und Thrombozytenaktivierung bei
Herzinsuffizienz**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Lennart Werner

aus Bremen

Würzburg, Januar 2013

Referent: Prof. Dr. Andreas Schäfer

Koreferent: Prof. Dr. Bernhard Nieswandt

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 11.12.2013

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

<u>1. Einleitung</u>	3
1.1 Die Herzinsuffizienz	4
1.2 Die Endotheldysfunktion	6
1.3 eNOS und eNOS-uncoupling	8
1.4 Momentane Therapie	9
1.5 Neue Therapieansätze	11
1.6 sGC-Aktivatoren	12
1.7 Ataciguat	13
<u>2. Methoden</u>	16
2.1 Induktion des Myokardinfarktes	17
2.2 Medikamentöse Therapie	18
2.3 Hämodynamische Untersuchungen	18
2.4 Organentnahme	19
2.5 Gefäßreaktivität im Organbad	20
2.6 Bestimmung der Superoxidanionen im Aortensegment	21
2.7 Durchflußzytometrie	22
2.8 Messung der VASP-Phosphorylierung	22
2.9. Substanzen	23
2.10. Statistik	23
<u>3. Ergebnisse</u>	24
3.1 Hämodynamik und Globalparameter	24
3.1.1 Infarktgrösse	24
3.1.2 Druckparameter	24
3.1.3 Weitere Messungen	25

3.2	Gefäßfunktion	27
3.2.1	Superoxidanionenproduktion	27
3.2.2	Phenylephrin-induzierte Vasokonstriktion	28
3.2.3	Endothel-abhängige Relaxation auf Acetylcholin	29
3.2.4	Endothel-unabhängige Relaxation auf DEA-NONOate	30
3.2.5	Inhibition der Abgabe von tonischem NO durch L-NNA	31
3.3	VASP-Phosphorylierung und Thrombozytenaktivierung	32

4. Diskussion 36

5. Zusammenfassung 42

6. Literaturverzeichnis 44

Anhang:

Abkürzungen

Danksagung

Lebenslauf

1. Einleitung

In der vorliegenden Studie wurden die Wirkungen eines neuartigen medikamentösen Therapiekonzeptes, des löslichen Guanylatzyklase(sGC)-Aktivators Ataciguat, auf die Endotheldysfunktion und den oxidativen Stress bei Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt untersucht. Um die Vorteile dieses modernen Ansatzes in der Therapie eines der am weitest verbreiteten Krankheitsbilder unserer Gesellschaft^{1,2} darzustellen, ist es nötig, nicht nur einen Überblick über das Krankheitsbild der Herzinsuffizienz und die gesundheitlichen Folgen, sondern auch über die momentanen Therapieansätze zu geben. Die Darstellung des zu Grunde liegenden Krankheitsbildes, der Pathomechanismen und der Wirkungsweise des getesteten Wirkstoffes erlauben eine Einschätzung der Therapiemöglichkeiten dieser neuen Wirkstoffklasse. Gerade bei einem derart häufigen und wichtigen Krankheitsbild spielt die ständige Weiterentwicklung der therapeutischen Möglichkeiten eine große Rolle, um die Effizienz der Therapie stetig zu verbessern und somit eine immer umfassendere, effizientere und nebenwirkungsärmere Behandlung der Auswirkungen der Krankheit zu ermöglichen. Unter aktueller Therapie hat die Herzinsuffizienz eine Letalität von ca. 35% in den ersten 2 Jahren und eine, abhängig vom Schweregrad, nur 40-50 prozentige 5-Jahres-Überlebensrate³, was in etwa der Prognose vieler maligner Erkrankungen entspricht. Diese Zahlen belegen, wie erstrebenswert eine Verbesserung der momentanen, offensichtlich nicht optimalen Therapie ist.

In dieser Arbeit wird zuerst das Syndrom der Herzinsuffizienz mit seinen möglichen Ursachen, aktuellen Therapien und neuen Therapieansätzen unter besonderer Berücksichtigung des Einsatzes von Ataciguat beschrieben. Danach werden die in den Versuchen angewandten Verfahren und Methoden sowie die Ergebnisse dieser Untersuchungen dargestellt, gefolgt von der Diskussion dieser Ergebnisse und einer kurzen Zusammenfassung.

1.1 Die Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz ist keine eigenständige Erkrankung, sondern ein komplexes klinisches Syndrom mit unterschiedlicher ätiologischer Genese. Gemeinsamer Aspekt der zu Grunde liegenden Erkrankungen ist per Definition die „Unfähigkeit des Herzens, das vom Organismus benötigte Herzzeitvolumen bei normalem enddiastolischen Ventrikeldruck zu fördern“⁴. Die Ursachen dieser Unfähigkeit können vielfältig sein, denn nicht nur Störungen der Eigenfunktion, sondern auch Störungen der Bedingungen innerhalb des Herz-Kreislaufsystems können eine Beeinträchtigung der suffizienten Funktion des Herzens nach sich ziehen. Differentialdiagnostisch kommt somit eine große Anzahl von Erkrankungen als Ursache in Frage. Die Bandbreite erstreckt sich hier von primär durch myokardiale Störungen bedingten Ursachen über intra- und extrakardiale Funktionsstörungen bis zu Druck- und Volumenbelastungen des Herzens. Die vier wichtigen Komponenten der beeinträchtigten Herzfunktion sind das Kontraktionsvermögen, die erhöhte Vorlast, die erhöhte Nachlast und die Behinderung der diastolischen Füllung des Herzens⁵. Jede dieser Komponenten kann durch mehrere unterschiedliche Grunderkrankungen gestört werden. So wird zum Beispiel das Kontraktionsvermögen bei Myokardischämien, Myokardinfarkten und dilatativen Kardiomyopathien gestört, während Septumsdefekte, Mitrals- und Trikuspidalinsuffizienzen und Niereninsuffizienz eine erhöhte Vorlast und arterielle Hypertonie, Aorten- und Pulmonalstenosen eine erhöhte Nachlast verursachen.

Die Vielfalt der möglichen ursächlichen Erkrankungen spiegelt sich auch in der klinischen Einteilung der Herzinsuffizienz wider. So unterscheidet man eine chronische und eine akute Herzinsuffizienz und beurteilt die Kompensation und damit die Auswirkung auf die Leistungsfähigkeit der Patienten. Abhängig von den im Vordergrund stehenden pathogenetischen Merkmalen differenziert man zwischen Vorwärts- und Rückwärtsversagen. Die Kriterien können nicht nur isoliert, sondern auch nebeneinander bestehen und weisen auf die Ursachen der Herzinsuffizienz hin. Um eine zutreffende Aussage über die Schwere der Erkrankung und die therapeutischen Möglichkeiten treffen zu können, beurteilt man die Herzinsuffizienz nach den Kriterien der New York Heart Association, die bereits 1952 eine

Stadieneinteilung der Herzinsuffizienz entwickelte. Diese sogenannten NYHA-Stadien beruhen sowohl auf objektiven, als auch auf subjektiven Kriterien und bewerten z.B. die körperliche Belastbarkeit des Patienten und das Herzminutenvolumen als Faktoren zur Beurteilung der körperlichen Einschränkung durch die Herzinsuffizienz⁶. Die Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit spielt nicht nur für das Wohl des Patienten eine entscheidende Rolle, sondern auch für die Dringlichkeit einer adäquaten Therapie und die Prognose der Erkrankung⁷⁻⁹.

NYHA-Klassifikation bei Herzinsuffizienz	
Funktionelle Klassifizierung	
I.	Herzerkrankung ohne körperliche Limitation. Alltägliche körperliche Belastung verursacht keine inadäquate Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot oder Angina pectoris.
II.	Herzerkrankung mit leichter Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit. Keine Beschwerden in Ruhe. Alltägliche körperliche Belastung verursacht Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot oder Angina pectoris.
III.	Herzerkrankung mit höhergradiger Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit bei gewohnter Tätigkeit. Keine Beschwerden in Ruhe. Geringe körperliche Belastung verursacht Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot oder Angina pectoris.
IV.	Herzerkrankung mit Beschwerden bei allen körperlichen Aktivitäten und in Ruhe. Bettlägrig

Tabelle 1 Die Herzinsuffizienz wird nach der Klassifikation der New York Heart Association abhängig von der funktionellen Beeinträchtigungen des Patienten in vier Schweregrade eingeteilt (aus: Therapieleitlinien Herzinsuffizienz, <http://www.akdae.de/Arzneimitteltherapie-TE/A-Z/PDF/Herzinsuffizienz.pdf#page=1&view=fitB>).

Eine überaus häufige Ursache der Herzinsuffizienz ist der Myokardinfarkt. In Deutschland liegt das Risiko, einmal im Leben einen Herzinfarkt zu erleiden, für Männer bei 30% und für Frauen bei 15%¹. Natürlich spielen das Alter und Risikofaktoren wie Diabetes, Adipositas, Rauchen und Hyperlipidämie eine

entscheidende Rolle¹⁰⁻¹³, sodass das Risiko eines Herzinfarktes stark variiert. Allein bei einem normalgewichtigen Mann ohne Risikofaktoren steigt dieses Risiko von 1% im Alter von 50 Jahren auf 10% im Alter von 80 Jahren. Nach Erleiden eines Herzinfarktes bildet sich nicht zwangsläufig eine Herzinsuffizienz aus, es kommt jedoch durch den Infarkt zur Beeinflussung der Funktion des Herzmuskels. Dieser Vorgang kann, wie bereits beschrieben, die Pumpleistung des Herzens stören und somit zur Herzinsuffizienz führen. Dies führt zu einer Veränderung der Bedingungen am Herzen und beeinflusst auch die Funktion des Gefäßendothels. Die Störung der Funktion des Endothels gefährdet nicht nur die suffiziente Versorgung von Organen und Peripherie, sondern beeinträchtigt auch die körperliche Belastbarkeit der Patienten. Zusätzlich wird auch die Versorgung des Herzens selber beeinträchtigt und somit die Leistung des Herzens weiter reduziert.

1.2 Die Endotheldysfunktion

Das gesunde Endothel hat die Aufgabe, die Blutzufuhr in die Organe zu steuern und somit eine möglichst optimale Versorgung der Organe zu erreichen. Dies geschieht hauptsächlich durch die vom Endothel gesteuerte Konstriktion und Dilatation der Gefäße. Diese werden vom Endothel durch die Produktion und Sekretion verschiedener Botenstoffe erreicht¹⁴. Die Endothelzellen können zur Regulation der Organ-durchblutung und des peripheren Widerstandes vasodilatative Stoffe wie z.B. Stickstoffmonoxid (NO), Prostaglandin I₂ und den „endothelium-derived hyperpolarising factor“ (EDHF) produzieren¹⁵. Die Gegenspieler dieser Vasodilatoren sind die vasokonstriktorisches Stoffe Angiotensin II, reaktive Sauerstoffradikale (O₂⁻), Endothelin-1 und Thromboxan¹⁶. Neben der Organdurchblutung spielt die Endothelfunktion aber auch eine entscheidende Rolle für die Belastbarkeit von Patienten, die unter Herzinsuffizienz leiden. Durch diesen Zusammenhang hat die Endotheldysfunktion einen entscheidenden Einfluss auf Morbidität und Mortalität dieser Erkrankung^{17, 18}.

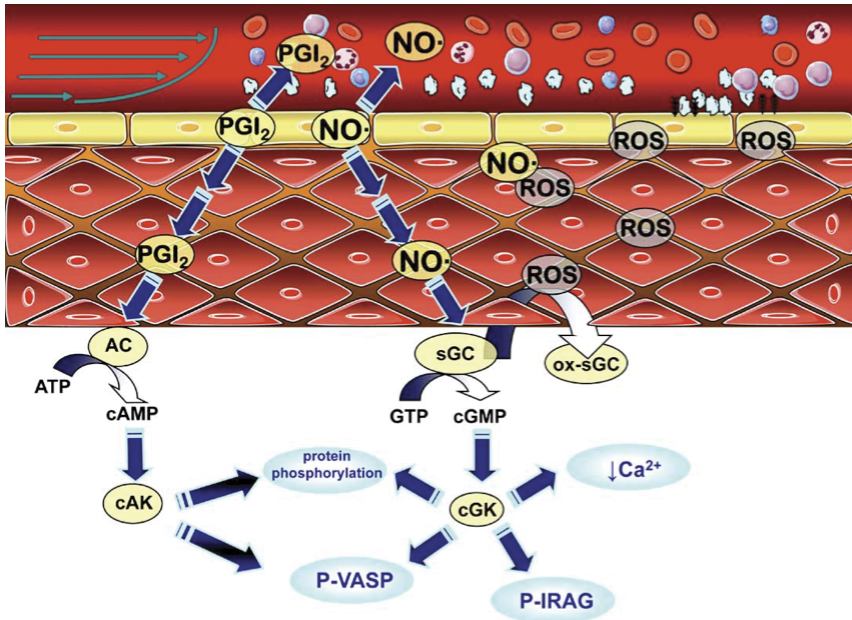


Abbildung 1. Der Blutfluss erzeugt in den Endothelzellen den Reiz für die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO). Das NO aus den Endothelzellen beeinflusst auf der luminalen Seite die Blutzellen, indem es die Thrombozyten inhibiert und deren Adhäsion am Endothel verhindert. Gleichzeitig beeinflusst das NO in der Gefäßwand die glatten Muskelzellen. In den Zielzellen aktiviert das NO die NO-sensitive lösliche Guanylatcyclase (sGC). Die intakte sGC katalysiert die Reaktion von Guanosintriphosphat (GTP) zu zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP). Das cGMP aktiviert anschliessend die cGMP-abhängige Kinasen (cGK), welche den Kalzium-Einstrom (Ca^{2+}) in die Zelle reduziert. Zusätzlich phosphoryliert die cGK mehrere Substrat-Proteine wie z. B. das vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein (VASP) und das inositol-1,4,5-triphosphate receptor I-assoziiertes Protein (IRAG).

Die vermehrte Produktion von vaskulären Sauerstoffradikalen (ROS) in der Gefäßwand ist ein grundlegender Pathomechanismus bei vielen kardiovaskulären Erkrankungen. Die ROS reduzieren die NO-Bioverfügbarkeit durch die Reaktion mit NO und oxidieren die sGC (ox-sGC) sodass das verminderte NO-Signal die sGC nicht mehr aktivieren kann, da die ox-sGC nicht NO-sensitiv ist.²² (aus: Schäfer A, Bauersachs J. Endothelial dysfunction, impaired endogenous platelet inhibition and platelet activation in diabetes and atherosclerosis. *Curr Vasc Pharmacol.* 2008;6:52-60)

Von der Endotheldysfunktion spricht man, wenn es zu einem Ungleichgewicht der Vasodynamik kommt¹⁹. Die Vasokonstriktion ist verstärkt, während sich die Vasodilatation verringert²⁰. Der Hauptgrund hierfür ist eine reduzierte Bioaktivität des wichtigsten endothelialen Vasodilatators, dem NO¹⁶. Gründe für diese reduzierte Bioaktivität sind die verminderte Expression der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS)^{4,21}, verminderte Verfügbarkeit von Substrat oder Co-Faktoren für die eNOS²², eine veränderte eNOS-Aktivität oder ein beschleunigter Abbau von Stickstoff-monoxid durch die Reaktion mit freien Sauerstoffradikalen²³⁻²⁷.

1.3 eNOS und eNOS-uncoupling

Die eNOS ist ein endotheliales Enzym, das mit Hilfe von Co-Faktoren aus Arginin und molekularem Sauerstoff NO synthetisiert²⁸. Der Hauptreiz für die Produktion von NO und für die Genexpression der eNOS ist die Schubspannung am Endothel²⁹. Bei der Herzinsuffizienz sorgt die verminderte linksventrikuläre Funktion für einen verminderten Blutfluss und somit für eine Abnahme der Schubspannung. Dieser Vorgang hat zur Folge, dass die Expression und Aktivität der eNOS und somit Sekretion von NO herabgesetzt sind, die Vasodilatation reduziert ist und somit das vasodynamische Gleichgewicht am Endothel gestört ist^{4, 21}. Die vasodilatativen Effekte des NO kommen über die Aktivierung einer Signalkaskade in den glatten Muskelzellen der Gefäßwand zustande. Dort aktiviert NO das Enzym sGC (lösliche Guanylatcyclase). Die sGC katalysiert die Reaktion von Guanosintriphosphat (GTP) zu zyklischem Guanosin-monophosphat (cGMP), welches die cGMP-abhängige Kinase (cGK) aktiviert. Dieser Vorgang führt zur Phosphorylierung verschiedener Proteine, einer Abnahme des zytosolischen Kalzium-Spiegels und einer Relaxation der glatten Muskelzellen. Diese Vorgänge zeigt Abbildung 1. Die Relaxation der Muskulatur hat eine Dilatation der Gefäße zur Folge. Dies ist ein entscheidender Schutzmechanismus des Endothels³⁰. Des Weiteren hat das Stickstoffmonoxid auch auf der luminalen Seite der Gefäße einen Effekt auf die Blutplättchen³¹. Durch Inhibition der Blutplättchen verhindert es deren Adhäsion am Endothel³². Diese Funktionen sind bei der endothelialen Dysfunktion stark beeinträchtigt. Es gibt jedoch neben der durch die verminderte Schubspannung herabgesetzten Expression der eNOS und der

verminderten Produktion von NO weitere Faktoren, die die Bioaktivität des Stickstoffmonoxids negativ beeinflussen.

Zusätzlich spielen reaktive Sauerstoffradikale eine zentrale Rolle^{33,34}. Normalerweise besteht ein Gleichgewicht zwischen NO und den reaktiven Sauerstoffradikalen³⁵. Die freien Sauerstoffradikale reagieren mit NO zu Peroxynitrit²⁸. Unter physiologischen Bedingungen wird hier durch Antioxidationsmechanismen das Gleichgewicht gewahrt. Bei der endothelialen Dysfunktion jedoch versagen diese Regulationsmechanismen. Stickstoffmonoxid wird nun zusätzlich durch die Reaktion mit den freien Sauerstoffradikalen verbraucht. Das Reaktionsprodukt, Peroxynitrit, kann den für die Synthese von NO unabdingbaren Cofaktor Tetrahydrobiopterin oxidieren^{36,37}. Die Verfügbarkeit von NO sinkt weiter und zusätzlich kommt es zu einem als „eNOS-uncoupling“ bekannten Phänomen. Hierbei synthetisiert die eNOS durch das oxidierte Tetrahydrobiopterin nicht mehr wie unter physiologischen Bedingungen NO, sondern freie Sauerstoffradikale^{37,38}. Diese erhöhte Produktion von freien Sauerstoffradikalen und die verminderte Bioverfügbarkeit von NO werden beim momentanen Stand der Forschung als Hauptursachen der Endotheldysfunktion bei mehreren Krankheitsbildern wie z.B. Hypertension, Diabetes und Herzinsuffizienz gesehen.

1.4 Momentane Therapie

Die momentane Therapie der verschiedenen Stadien der Herzinsuffizienz beinhaltet eine große Anzahl verschiedener Pharmakotherapeutika, die über die Beeinflussung verschiedener Aspekte der zu Grunde liegenden Pathologien versuchen, die Herz- und Gefäßfunktion und somit die Blutversorgung der Organe zu verbessern. Hierbei steht die Modulation der Endotheldysfunktion aktuell im Vordergrund. Wie beschrieben, sind die erhöhte Produktion von Sauerstoffradikalen und die verminderte Bioverfügbarkeit von NO die Schlüsselfaktoren.

Ein wichtiger Faktor für die Generierung der reaktiven Sauerstoffradikale ist die neurohumorale Aktivierung mit Stimulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systemes (RAAS)³⁹, welches bei Patienten mit Herzinsuffizienz stark aktiviert ist^{40,41}.

Die momentanen Therapie-Ansätze zielen auf die Beeinflussung dieses Systemes ab. Ein fester Bestandteil sind hier die ACE-Hemmer, die die Produktion von Angiotensin II hemmen und somit die durch Angiotensin II stimulierte Produktion von freien Sauerstoffradikalen verringern^{42, 43}. Die ACE-Hemmer haben nachgewiesenermaßen eine positive Wirkung auf Mortalität und Morbidität von Patienten mit Herzinsuffizienz^{41, 44, 45}. Durch die Senkung der Konzentration der freien Sauerstoffradikale erhöhen die ACE-Hemmer die Verfügbarkeit von NO am Endothel⁴². Die Verbesserung der Herzfunktion und damit die Verminderung der Schubspannung am Endothel sowie die direkte Erhöhung der endothelialen Expression von eNOS durch die Inhibition des ACE verbessern die verminderte Expression der eNOS⁴⁶⁻⁴⁸. Unabhängig von dem Schweregrad der Herzinsuffizienz bilden die ACE-Hemmer aktuell die Grundlage der medikamentösen Therapie der Herzinsuffizienz. Der gleiche Ansatz findet sich bei der Therapie mit Angiotensin II-Antagonisten. Auch diese verhindern die Bindung von Angiotensin II an dessen Rezeptoren im Herz- und Gefäßsystem und verbessern dadurch die Gefäßfunktion⁴⁹.

Zur Verbesserung des therapeutischen Potentials ist eine Kombinationstherapie von ACE-Hemmern bzw. Angiotensin-II-Antagonisten mit einem Aldosteron-Antagonisten möglich. Bei längerer Therapie mit ACE-Hemmern oder AT-II-Blockern kommt es zu einem „aldosterone-escape“ genannten Phänomen, bei dem eine längerfristige Verminderung der Aldosteron-Produktion nicht aufrechterhalten werden kann⁵⁰. Erhöhte Plasmaspiegel von Aldosteron sind unabhängig von Angiotensin II ein Indikator für eine schlechtere Krankheitsprognose^{51, 52}. Die Kombination der ACE-Hemmer bzw. AT-II-Blocker mit Aldosteron-Antagonisten vermindert die Mortalität und verbessert die Endothelfunktion⁵³. Trotz des insgesamt erheblichen therapeutischen Potentials von ACE-Inhibitoren, AT-II-Blocker und ihrer Kombination mit Aldosteron-Antagonisten mit der Verbesserung grundlegender Mechanismen der Pathologie der Herzinsuffizienz sind sie jedoch nicht in der Lage, die Produktion von Angiotensin II vollständig zu verhindern und die Funktion des Endothels komplett wiederherzustellen.

Ebenfalls Teil der aktuellen Therapie sind die Statine, die unspezifisch eine Erhöhung der Expression von eNOS^{54, 55} zur Folge haben und die durch Angiotensin-II induzierte Produktion von Sauerstoffradikalen verhindern⁵⁶. Zusätzlich sind weitere

positive Effekte auf die Gefäßfunktion bekannt, wie die Verbesserung der Schubspannung und die höhere Expression der eNOS^{57, 58}. Die Therapie mit Statinen vermindert außerdem das Risiko der Patienten, überhaupt eine Herzinsuffizienz auszubilden⁵⁹. Doch ähnlich wie bei den ACE-Hemmern und Angiotensin-II-Antagonisten erlaubt auch die Therapie mit Statinen keine vollständige Wiederherstellung der Gefäßfunktion.

1.5 Neue Therapieansätze

Auf die Wiederherstellung der Endothelfunktion zielen neuere Therapieansätze ab. Das Verständnis der molekularen Vorgänge am Endothel und in den glatten Muskelzellen bei der Endotheldysfunktion erlaubt neue Ziele für die medikamentöse Therapie und somit auch die Entwicklung neuer Therapieoptionen. Dies bietet die Möglichkeit, auf einzelne Aspekte der molekularen Vorgänge zuzugreifen und durch die gezielte Beeinflussung der Veränderungen einen Ansatz zur Wiederherstellung der physiologischen Gefäßfunktion zu finden.

Ein logischer Ansatz ist die Verbesserung der NO-Bioverfügbarkeit am Endothel. Die einfachste und naheliegende Möglichkeit der Erhöhung der NO-Bioverfügbarkeit ist die Gabe von exogenem NO. Dies ist zwar kurzfristig eine Möglichkeit, bei längerer Durchführung kommt es hierbei jedoch zu zwei Problemen. Zum einen wird eine NO-Toleranz induziert⁶⁰, die nicht nur das exogene, sondern auch das vom Endothel produzierte, also endogene, NO betrifft. Außerdem sorgt das bereits erwähnte eNOS-uncoupling, hervorgerufen durch die vermehrte Reaktion von freien Sauerstoffradikalen mit dem exogenen NO, für einen deutlichen Anstieg der Konzentration von freien Sauerstoffradikalen^{37, 61-63}. Dies führt zu einer deutlichen Verschlechterung der Funktion des Endothels. Somit lässt sich sagen, dass die reine Verstärkung der eNOS-Aktivität durch die Gabe von NO-Donatoren für die Langzeittherapie eher nicht empfehlenswert ist.

1.6 sGC-Aktivatoren

Ein weiteres Ziel der medikamentösen Therapie ist das Enzym sGC in den Gefäßmuskulzellen, welches die intrazelluläre Signalkaskade aktiviert, die am Ende zur Relaxierung der Muskulatur und somit zur Dilatation der Gefäße führt. Hierbei ist von großer Bedeutung, dass das Enzym eine Häm-Komplexverbindung besitzt, die nur bei Vorliegen des Eisenmoleküls in Fe^{2+} -Form NO-sensitiv ist, also von Stickstoffmonoxid überhaupt aktiviert werden kann. Unter erhöhter Konzentration von freien Sauerstoffradikalen, wie sie unter den Bedingungen der Endotheldysfunktion zu finden ist, wird dieses zentrale Eisenmolekül jedoch oxidiert. Liegt das Eisenmolekül in der oxidierten Form vor, ist das Enzym nicht mehr NO-sensitiv und somit funktionsuntüchtig.

In Anbetracht dieser Problematik bleiben zwei grundlegende Überlegungen für eine mögliche Verbesserung der Endothelfunktion, welche beide die NO-unabhängige Aktivierung der Signalkaskade beinhalten, entweder über die Aktivierung der NO-sensitiven Form des sGC-Enzyms oder aber über eine Häm-unabhängige Aktivierung der oxidierten Form des Enzyms. Beide Möglichkeiten setzen direkt an der sGC an und aktivieren somit unabhängig von NO die Signalkaskade in den Gefäßmuskulzellen. Die ersten Substanzen dieser als sGC-Stimulatoren bekannten Wirkstoffklasse waren Häm-abhängige Aktivatoren. Das bedeutet, dass diese Wirkstoffe zwar unabhängig von NO jedoch nur die noch nicht-oxidierte, also funktionstüchtige sGC stimulieren. Diese Häm-abhängigen sGC-Stimulatoren sorgen nachgewiesenermaßen für eine permanente Erhöhung der intrazellulären cGMP Spiegel^{64, 65} und stimulieren somit die Signalkaskade, die unter physiologischen Bedingungen durch die Aktivierung mit NO zur Vasodilatation führt. Zusätzlich bewirken sie eine Verbesserung der kardialen Auswurfleistung und der Nierendurchblutung^{66, 67}.

Neuerdings liegt der Fokus jedoch auf der oxidierten Form der sGC⁶⁸. Über eine Stabilisierung und Aktivierung dieser nativ funktionsuntüchtigen Enzyme hofft man, einen wirkungsvollen Ansatz gefunden zu haben, um die Endothelfunktion entscheidend verbessern zu können.

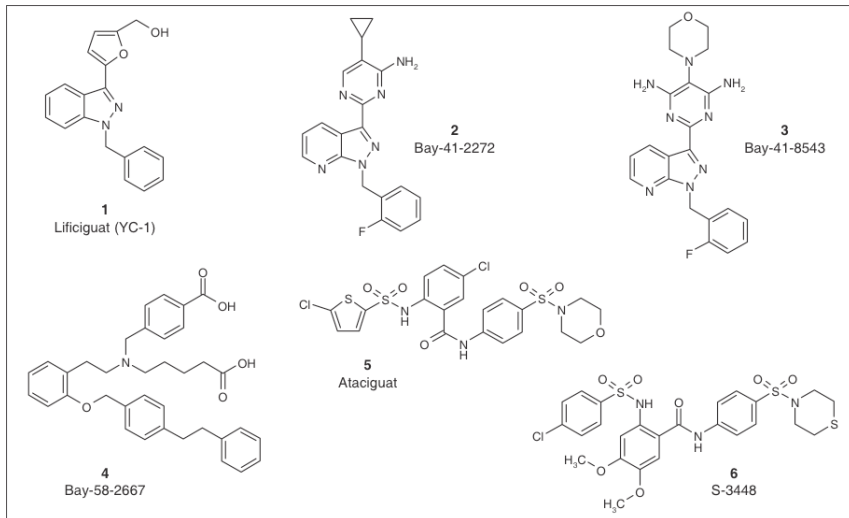


Abbildung 2. Übersicht der chemischen Struktur einiger sGC-Aktivatoren. Das in dieser Studie untersuchte Medikament Ataciguat (5) wurde unter der Bezeichnung HMR 1766 entwickelt und bildet zusammen mit S-3448 (6) eine neue Strukturklasse der sGC-Aktivatoren, die in der Lage sind, die oxidierte oder inaktivierte Form der sGC zu aktivieren. (aus Schäfer A, Bauersachs J. Therapeutic targets of Ataciguat. *Drugs of the future* 2007, 32(7))

1.7 Ataciguat

Das in dieser Studie untersuchte Medikament Ataciguat (entwickelt unter der Bezeichnung HMR 1766) ist ein Aktivator eben dieser Häm-oxidierten und somit inaktivierten Form der sGC⁶⁹. In bereits veröffentlichten Studien konnten durch die Therapie mit dieser Form der sGC-Aktivatoren sowohl deutlich erhöhte cGMP-Level in den glatten Muskelzellen von Rattenarten als auch verbesserte Endothelfunktion nachgewiesen werden⁷⁰. In weiteren Versuchen wurde gezeigt, dass Ataciguat die Entwicklung von pulmonaler Hypertension und Rechtsherzhypertrophie mindert und den Gasaustausch und den Output des Herzens verbessert⁷¹.

Neben diesen sogenannten „Endothel-abhängigen“ Effekten auf die Gefäßfunktion hat Ataciguat noch Wirkmechanismen, die unabhängig von der Gefäßfunktion wirken⁷². Auch für diese „endothel-unabhängigen“ Effekte ist eine protektive Wirkung bei

Krankheitsbildern mit herabgesetzter Bioverfügbarkeit von NO, wie zum Beispiel der Herzinsuffizienz, nachgewiesen. Das Ziel dieser „endothel-unabhängigen“ Wirkung sind die Blutplättchen bzw. die molekularen Vorgänge in den Blutplättchen, die zu deren Aktivierung führen⁷³⁻⁷⁵.

Die Aktivierung der Blutplättchen steht in direktem Zusammenhang mit der Bioverfügbarkeit von NO. Der Hintergrund dieses direkten Zusammenhanges ist bisher noch nicht geklärt, es wurde jedoch in mehreren Studien bewiesen, dass Aktivierung, Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten direkt mit der NO-Bioverfügbarkeit zusammenhängen. Die Grundlage für die Aktivierung ist ein Signalweg, der ähnlich dem in den glatten Muskelzellen, durch NO aktiviert wird. Es folgt eine Erhöhung des cGMP-Spiegels in den Blutplättchen und am Ende eine Phosphorylierung des „vasodilator-stimulated phosphoprotein“ (VASP), welches ein wichtiger Regulator der Inhibition der Aktivierung der Blutplättchen ist. Eine erhöhte Aktivierung der Blutplättchen hat zur Folge, dass die Wahrscheinlichkeit für thrombembolische Ereignisse und für die Formierung atherosklerotischer Läsionen deutlich steigt. Die Phosphorylierung von VASP ist ein etablierter Marker für die intraluminale NO-Bioverfügbarkeit und gibt Hinweise auf die Aktivierung bzw. Inhibition der Blutplättchen⁷⁶⁻⁸¹.

In der vorliegenden Studie werden die verschiedenen Aspekte der Wirkung des sGC-Aktivators Ataciguat untersucht und sowohl die Effekte des Wirkstoffes auf die Gefäßfunktion als auch auf die Funktion der Blutplättchen beobachtet und bewertet.

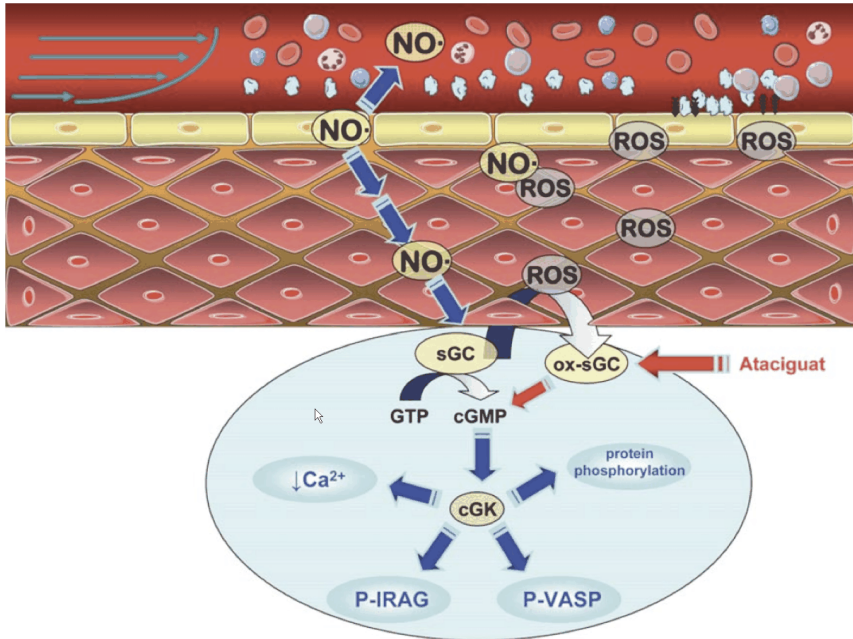


Abbildung 3. Der Blutfluss erzeugt in den Endothelzellen den Reiz für die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO). Das NO aus den Endothelzellen beeinflusst auf der luminalen Seite die Blutzellen, indem es die Thrombozyten inhibiert und deren Adhäsion am Endothel verhindert. Gleichzeitig beeinflusst das NO in der Gefäßwand die glatten Muskelzellen. In den Zielzellen aktiviert das NO die NO-sensitive lösliche Guanylatcyclase (sGC). Die intakte sGC katalysiert die Reaktion von Guanosinriphosphat (GTP) zu zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP). Das cGMP aktiviert anschliessend die cGMP-abhängige Kiniase (cGK), welche den Kalzium-Einstrom (Ca^{2+}) in die Zelle reduziert. Zusätzlich phosphoryliert die cGK mehrere Substrat-Proteine wie z. B. das vasodilatator-stimuliert phosphoprotein (VASP) und das inositol-1,4,5-triphosphate receptor I-associated protein (IRAG).

Die vermehrte Produktion von vaskulären Sauerstoffradikalen (ROS) in der Gefäßwand ist ein grundlegender Pathomechanismus bei vielen kardiovaskulären Erkrankungen. Die ROS reduzieren die NO-Bioverfügbarkeit durch die Reaktion mit NO und oxidieren die sGC (ox-sGC) sodass das verminderte NO-Signal die sGC nichtmehr aktivieren kann, da die ox-sGC nicht NO-sensitiv ist. Ataciguat stimuliert die oxidierte sGC und sorgt damit für eine Verbesserung der cGMP-abhängigen Aktivierung der cGK bei kardiovaskulären Erkrankungen mit einer erhöhten Produktion von freien Sauerstoffradikalen. (aus Schäfer A, Bauersachs J. Therapeutic targets of Ataciguat. *Drugs of the future* 2007, 32(7))

2. Methoden

Das Ziel der Studie war, zu beantworten, ob die Langzeittherapie mit Ataciguat die Endotheldysfunktion und Aktivierung der Blutplättchen in der chronisch-stabilen Phase der Herzinsuffizienz verbessert. Für die Versuchsreihe wurden ausschließlich männliche Wistar Ratten (Harlan-Winkelmann, Borcheln, Deutschland) verwendet. Die Ratten wurden entsprechend eines etablierten experimentellen Modells einer Operation unterzogen, um bei einem Teil der Tiere durch eine Ligatur des Ramus interventricularis anterior der Arteria coronaria sinistra einen Myokardinfarkt zu induzieren⁸². Als Kontrollgruppe wurde bei einigen Tieren eine Scheinoperation ohne Induktion des Myokardinfarkts durchgeführt. Alle Ratten hatten vor der initialen Operation ein Gewicht von 250 – 300 Gramm. Während der kompletten Studienzzeit verlief die Unterbringung für alle Tiere unter identischen Bedingungen. Es waren maximal fünf Tiere pro Käfig untergebracht und es bestand freier Zugang zu Wasser und Standard-Rattenfutter. Die Raumtemperatur betrug konstant $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ und die Luftfeuchtigkeit 55%. Zusätzlich wurde über eine Zeitschaltuhr ein fester 12 Stunden Hell- / Dunkelrhythmus aufrechterhalten.

Zehn Tage nach der Operation wurden die Ratten randomisiert und in drei Gruppen aufgeteilt. Die Tiere, bei denen kein Myokardinfarkt induziert wurde, dienten als Kontrollgruppe. Die restlichen Tiere wurden in zwei Gruppen eingeteilt und in den folgenden zehn Wochen mit einer Placebo-Lösung (5% Gum Arabicum Lösung) oder einer Suspension mit Ataciguat (5% Gum Arabicum Lösung + Ataciguat 10mg/kg) behandelt. Dieser Zeitraum wurde gewählt, um sicher zu stellen, dass sich die Tiere zum Zeitpunkt der nachfolgenden Untersuchungen in der chronisch-stabilen Phase der Herzinsuffizienz befanden. Die Verabreichung der Suspensionen erfolgte zweimal pro Tag, morgens und abends, immer ungefähr zur gleichen Zeit über eine Schlundsonde. Zehn Wochen nach Beginn wurde die Therapie beendet und am Folgetag die hämodynamischen Untersuchungen an den Tieren vorgenommen sowie die Infarktgrößen ermittelt. Hierfür wurden die Ratten mit Isofluran betäubt, intubiert und kontrolliert beatmet. Es wurden die hämodynamischen Messungen durchgeführt und anschließend Herz und der thorakale Abschnitt der Aorta operativ entnommen und für in vitro-Versuche verwendet.

2.1 Induktion des Myokardinfarktes

Die Operation zur Induktion des Myokardinfarktes wurde mit der Einleitung der Narkose der Ratten begonnen. Die Ratten wurden mit Isofluran narkotisiert und, nachdem sie gewogen worden waren, an dem Arbeitsplatz auf einer beheizten Unterlage fixiert. Um den Thorax für die Operation gut zugänglich zu machen, wurden die vorderen Extremitäten vom Körper der Ratte abgestreckt und fixiert. Für die Zeit der Narkose wurden die Ratten nach endotrachealer Intubation über einen Kleintier-Respirator (Rodent Ventilator UB 7025) mit einer Frequenz von 90 Atemzügen pro Minute und einem Atemzugvolumen von 2,5 ml beatmet. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte über einen Anästhesie-typischen Isofluran-Verdampfer.

Nach Desinfektion des Operationsgebietes mit Neokodan wurden das Fell und die Haut aufgeschnitten, die Thoraxmuskulatur aufgedehnt und zwischen der zweiten und dritten Rippe ein Zugang in die Thoraxhöhle geschaffen. Durch diesen Zugang wurde nach Eröffnung des Perikards das Herz durch seitlichen Druck luxiert. Am luxierten Herzen wurde die linke Koronararterie aufgesucht und der Ramus interventricularis anterior kurz nach seinem Abgang aus dem linkskoronaren Hauptstamm mit einem nicht-resorbierbaren Faden (Prolene 5-0-Faden) umstochen und dann ligiert. Bei den für die Kontrollgruppe vorgesehenen Tieren erfolgte die Operation in gleicher Art und Weise, es wurde jedoch kein Koronargefäß ligiert und somit kein Myokardinfarkt induziert.

Nach der Ligatur wurde das Herz reponiert, die Muskulatur ebenfalls mit einem resorbierbaren Faden (2/0 Perma Handseide) vernäht und Fell und Haut mit Klammern verschlossen. Nach abschließender Desinfektion des Operationsgebietes blieben die Ratten bis zum Erlangen der Spontanatmung intubiert und beatmet und wurden nach der Extubation postoperativ fünf Stunden überwacht. Bei in diesem Zeitraum auftretenden kardialen Problemen wurde eine Herzdruckmassage durchgeführt. Anschließend wurden die Ratten wieder in ihren Käfigen untergebracht und zur Identifikation mit einer Nummerierung auf dem Schwanz versehen.

2.2 Medikamentöse Therapie

Die medikamentöse Therapie der Ratten begann zehn Tage nach der Myokardinfarktoperation. Dieser zeitliche Abstand wurde gewählt, um möglichst wenig Einfluss auf Infarktheilung und Narbenbildung zu nehmen. Am zehnten postoperativen Tag wurden die zuvor koronarligierten Ratten nach dem Zufallsprinzip in zwei Gruppen eingeteilt. Jede Gruppe wurde in den darauf folgenden zehn Wochen unter identischen Bedingungen mit unterschiedlichen Medikamenten versorgt. Die Verabreichung der Medikamente erfolgte in einer Suspension über eine Schlundsonde. Jeden Tag wurden den Tieren einmal morgens und einmal abends zur ungefähr gleichen Zeit die Suspensionen verabreicht. Die Tiere der Kontrollgruppe, bei denen kein Myokardinfarkt vorlag, sondern bei denen nur eine Scheinoperation durchgeführt worden war, bekamen eine Placebolösung (5% Gum arabicum). Eine zweite Kontrollgruppe aus Tieren, die einen Myokardinfarkt induziert bekommen hatten, wurde ebenfalls mit der Placebolösung versorgt. Für die dritte Gruppe wurde in die als Placebo verwendete 5% Gum arabicum Lösung Ataciguat (sanofi-aventis, Frankfurt/Main, Deutschland) in einer Dosis von 10 mg/kg zugefügt.

2.3 Hämodynamische Untersuchungen

Zehn Wochen nach OP wurden die hämodynamischen Messungen durchgeführt. Hierfür wurden die Ratten erneut mit Isofluran narkotisiert, gewogen, intubiert und unter denselben Bedingungen wie bei der Myokardinfarktoperation beatmet. Zur Bestimmung des linksventrikulären systolischen und diastolischen Drucks sowie der maximalen Druckentwicklung wurde die rechte Arteria Carotis mit einem Polyethylen-Katheter (PE 50) kanüliert. Um in die linke Herzkammer zu gelangen wurde der Katheter vorsichtig vorgeschoben, während über einen Mikro-Tip-Katheter (SPR-774, Millar-Instruments, Houston, Texas, USA) ständig die korrekte Lage des Katheters anhand einer Druckkurve kontrolliert wurde. Es erfolgten kontinuierliche Messungen des linksventrikulären systolischen und diastolischen Blutdrucks, sowie die Messung der maximalen Druckentwicklung über die Zeit. Nach Abschluß dieser Messungen wurde der Katheter aus dem Ventrikel in die Aorta zurückgezogen und es

erfolgten Messungen des systolischen und diastolischen Aortendrucks sowie des aortalen Mitteldrucks.

2.4 Organentnahme

Für die weiteren Versuche und Funktionsprüfungen wurden nach den hämodynamischen Messungen bestimmte Organe entnommen. Zuerst wurde der Thorax eröffnet und das Herz entnommen. Danach wurde der Thorax beidseits lateral weiter eröffnet. Zur Entnahme der Lunge wurde die Trachea aufgesucht und durchtrennt. Um das Ausmaß des Lungenödems als Folge der chronischen Herzinsuffizienz zu messen, wurden die Lungen entnommen und direkt nach Entnahme gewogen, eine Woche lang in einem Trockenofen bei 40° C getrocknet und anschliessend erneut gewogen. Die Differenz der beiden Messwerte entspricht dem Nettogewicht der sich in den Lungen befindlichen Flüssigkeit. Für die weiteren Versuche wurden Segmente der Aorta thoracalis benötigt. Diese wurde nach Entnahme der Lunge intrathorakal aufgesucht und auf Höhe des Zwerchfells durchtrennt. In der Folge wurde die Aorta in HEPES-modifiziertem Krebs-Puffer aufbewahrt und dort vorsichtig unter Vermeidung von Schäden am Endothel präpariert. Hierbei wurde die Aorta von umliegendem Fettgewebe befreit und dann in mehrere Segmente geteilt. Diese Segmente wurden für die Versuche im Luminometer und im Organbad verwendet. Zwei distale, ca. 5 mm große Segmente der Aorta wurden für die Messung der Superoxidanionenproduktion im Luminometer verwendet, während zwei weitere ca. 3 mm große Aortenringe für die Versuche im Organbad verwendet wurden. Zur Bestimmung der Infarktgröße wurden die entnommenen Herzen gewogen und anschließend der linke Ventrikel vom restlichen Herz abgetrennt und in die drei Abschnitte Apex, mittlerer Ring und Basis eingeteilt. Aus dem mittleren Ring wurden aus 5 µm dicken Abschnitten dünnere Schichten in 100 µm-Intervallen geschnitten und mit picosirius red gefärbt.

2.5 Organbad

Zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit der glatten Muskulatur der entnommenen Aortensegmente wurden diese in ein Organbad von Föhr Medical Instruments eingehängt. In diesem Organbad befanden sie sich permanent in einer Krebs-Lösung (NaCl 118 mmol/L, KCl 4,7 mmol/L, MgSO₄ 1,2 mmol/L, CaCl₂ 1,6 mmol/L, KH₂PO₄ 1,2 mmol/L, NaHCO₃ 25 mmol/L, Glukose 12 mmol/L), die bei Bedarf durch ein Pumpsystem ausgewaschen und erneuert werden konnte. Um einen konstanten pH-Wert von 7,34 zu erreichen, wurde ein Gasgemisch aus 95% O₂ und 5% CO₂ zur Lösung zugeführt. Neben dem konstanten pH-Wert wurde durch die Umspülung der Glasgefäße mit vorgewärmtem Wasser eine konstante Temperatur von 37° C aufrechterhalten. Die Gefäßsegmente wurden im Organbad zwischen zwei Haken gespannt, von denen der obere Haken am Kraftaufnehmer eingehängt und der untere Haken fixiert war. Mit einer Mikrometerschraube wurde nun 2 Gramm Vorspannung auf die Aortensegmente eingestellt. Der Kraftaufnehmer, an dem der obere der beiden Haken eingehängt worden war, leitete automatisch ein Signal an einen angeschlossenen Computer weiter, welcher die Signale kontinuierlich mit dem Programm Vitrodat® aufzeichnete. Zum Erreichen der gewünschten Vorkontraktion wurden die Gefäße nach mehrfachem Training mittels KCl durch L-Phenylephrin (PE) kontrahiert.

Zur Überprüfung der Endothelfunktion wurde nun nach der erfolgten Vorkontraktion mit PE (10⁻⁶M) Acetylcholin (ACh, 10⁻⁶ M) zugefügt. Hierbei wurden die Aortensegmente, die bei der Operation bzw. Präparation beschädigt worden waren aussortiert. Die beschädigten Segmente zeigten keine Relaxation auf die ACh-Gabe. In diesem Fall wurde der Versuch abgebrochen und an dem betroffenen Segment wurden keine weiteren Versuche durchgeführt. Bei den unbeschädigten Aortensegmenten wurde anschließend eine PE Konzentrations-Wirkungskurve zur Evaluation des Kontraktionsverhaltens durchgeführt. Anschließend wurde nach Auswaschen und Vorkontraktion der Gefäße auf vergleichbare Vorkontraktionen die Endothelfunktion geprüft, indem kumulative Konzentrationen von Acetylcholin gegeben wurden. Zusätzlich wurde nach geringer Vorkontraktion auf etwa 20% mit PE die Kontraktion auf die Zugabe von N⁰-Nitro-L-Arginin (LNNA, 100 µmol/L) als

Zeichen der physiologischen, dehnungsinduzierten und Kalzium-unabhängigen NO-Formation gemessen ⁸³. Ebenso wurde die Sensitivität der glattmuskulären Guanylatzyklase durch die Reaktion auf den endothel-unabhängigen Vasodilatator DEA-NONOate (Alexis Biomedicals, San Diego, CA) in kumulativen Konzentrationen nach Vorkontraktion mit PE (10^{-6} M) ermittelt.

2.6 Bestimmung der Superoxidationen im Aortensegment

Zur Bestimmung der vaskulären Superoxidationbildung in den Versuchstieren wurde ein etwa 5 mm grosses Segment der Aorta thoracalis jedes Versuchstieres verwendet. Das Segment der Aorta thoracalis wurden nach der Entnahme in einem HEPES-modifizierten Krebs-Puffer gelegt, von dem anhaftenden Gewebe unter dem Mikroskop freipräpariert und durchgespült.

Die Messung der Superoxidationenproduktion erfolgte über die Lucigenin-verstärkte Chemolumineszenz in einem Wallac 1251 Luminometer (Wallac, Freiburg). Bei dieser etablierten Methode ³⁴ misst das Luminometer in einem vorher festgelegten Intervall (30 Sekunden) das emittierte Licht und somit die Lichtreaktion zwischen den Superoxidationen und Lucigenin. Die Aortensegmente wurden in dem Luminometer in HEPES-modifiziertem Krebs-Puffer auf 37°C gehalten. Zuerst erfolgte eine Leermessung des Puffers mit Lucigenin (5 $\mu\text{mol/L}$), um später eine Aussage zur Differenz der Hintergrundaktivität und der gemessenen Aktivität nach Zusatz des Aortenringes treffen zu können. Sowohl die Leermessung, als auch die Messungen nach Zugabe des Aortensegmentes fanden über einen Zeitraum von 15 Minuten mit einem Intervall von 30 Sekunden statt. Die Werte der Leermessungen wurden gemittelt. Nach Zugabe der Aortenstücke wurden zu den Zeitpunkten 0, 5, 10 und 15 Minuten ebenfalls Durchschnittswerte der benachbarten Messungen errechnet. Die spezifische Chemo-lumineszenz wurde als counts pro Minute pro Milligramm Trockengewicht des Gewebes (cpm/mg) ausgedrückt.

2.7 Durchflußzytometrie (Bestimmung der Thrombozytenaktivierung)

Vollblutproben aus Citratblut (3,8%) der Versuchstiere wurden mit PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} , mit Zusatz von D-Glukose [5,5 mmol/L] und 0,5%BSA) verdünnt und zur Bestimmung der Oberflächenexpression von P-Selektin als Hinweis auf die Thrombozytenaktivierung mit einem FITC-anti-P-Selektin-Antikörper (BioCytex, Marseille, Frankreich) inkubiert. Die mit dem Antikörper inkubierten Thrombozyten wurden nun mit Methanol-freiem Formaldehyd (1,5%) 10 Minuten lang fixiert und anschliessend in einem Becton Dickinson FACSCalibur bei niedriger Durchflussrate analysiert. Die Thrombozytenpopulation wurde anhand ihrer spezifischen Vorwärts- und Seitwärts-Streuverhalten identifiziert und die durchschnittliche Fluoreszenz mit der CELLQuest-Software gemessen.

2.8 Messung der VASP-Phosphorylierung

Zur Messung der Phosphorylierung des VASP als direktem Marker für die Wirkung der endogenen Mediatoren Stickstoffmonoxid und Prostazyklin *in vivo* auf die Blutplättchen wurden Proben aus Citratblut (3,8%) der Versuchstiere in Methanol-freiem Formaldehyd (1,5%, 5 Minuten) fixiert, mit PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} , mit Zusatz von D-Glukose [5,5 mmol/L] und 0,5%BSA) verdünnt und 10 Minuten lang mit Triton X 100 (0,2% final) permeabilisiert. Anschliessend wurden die Proben jeweils in zwei Anteile aufgeteilt und bei Raumtemperatur 45 Minuten mit einem FITC-markiertem Antikörper gegen phosphoryliertes VASP-Ser²³⁹(16C2 Antikörper [500 µg/mL], nano tools, Teningen, Deutschland) inkubiert. Eine der Proben wurde vor der Zugabe des Antikörpers 30 Minuten bei 4°C mit einem spezifischen blockenden Phosphopeptid vorinkubiert, um nicht-spezifische Bindungen des Antikörpers korrigieren zu können. Nach der Inkubation wurde die Fluoreszenz mit einem FACSCalibur Durchflußzytometer gemessen. Die Analyse der Messungen erfolgte ohne Wissen der Therapie bzw. des Ausmaßes der Herzinsuffizienz des jeweiligen Versuchstieres.

Um den direkten Effekt von Ataciguat auf die Thrombozyten unabhängig von den übrigen Versuchen zu untersuchen, wurden Thrombozyten aus thrombozytenreichem

Plasma der Kontrolltiere mit Ataciguat (10 μ mol/L, 10 min) stimuliert und deren VASP-Phosphorylierung gemessen.

2.9. Substanzen

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Medikamente und biochemischen Substanzen von der Firma Sigma (Deisenhofen, Deutschland) in der höchstmöglichen Reinheit bezogen und verwendet.

2.10. Statistik

Alle Daten sind errechnete Mittelwerte \pm S.E.M (standard-error of the mean). Die Analyse der Statistiken erfolgte durch wiederholte ANOVA (analysis of variance) und einen anschließenden Tukey-Kramer multiple comparison-Test. Die Ergebnisse der hämodynamischen Untersuchungen wurden mittels ANOVA und Tukey-Kramer post hoc-Test analysiert. Als statistisch relevant gewertet wurden P-Werte von $<0,05$.

3. Ergebnisse

3.1 Hämodynamik und Globalparameter

Zur Beurteilung der Effekte von Ataciguat wurden ausschließlich Versuchstiere mit präsepter Herzinsuffizienz trotz medikamentöser Therapie analysiert. Die Beurteilung der Ausprägung der Herzinsuffizienz erfolgte anhand des erhöhten linksventrikulären enddiastolischen Drucks, der reduzierten Kontraktionsfähigkeit des linken Herzens und des Ausmaßes des Myokardinfarktes. Nach Ausschluss der Tiere, welche die Kriterien nicht erfüllten, blieben in den beiden Versuchsgruppen 14 Tiere in der Gruppe mit Myokardinfarkt und Placebo-Therapie (CHF-Placebo-Gruppe) bzw. 10 Tiere in der Gruppe mit Myokardinfarkt und Ataciguat-Therapie (CHF-HMR-Gruppe) sowie 13 scheinoperierte Tiere der Kontrollgruppe übrig und wurden in die Studie einbezogen.

Die hämodynamischen und allgemeinen Parameter zur Beurteilung der manifesten Herzinsuffizienz bei den beiden Versuchsgruppen mit induziertem Myokardinfarkt sowie der scheinoperierten Kontrollgruppe zeigt Tabelle 1.

3.1.1 Infarktgröße

Um eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurde die Infarktgröße bestimmt und nur Tiere mit einer Infarktgröße von mindestens 45 % des linken Ventrikels wurden in die Studie aufgenommen. Wie in Tabelle 1 zu sehen, betrug die mit der beschriebenen Methode ermittelte Größe des induzierten Myokardinfarktes bei den mit der Placebo-Lösung therapierten Tieren 49 ± 2 %. Bei den mit Ataciguat therapierten Tieren ergaben die Messungen einen Wert von 49 ± 1 % und damit keinen signifikanten Unterschied. Somit ist die Vergleichbarkeit der anschließenden Messungen sowie der weiteren ermittelten Parameter gewährleistet.

3.1.2 Druckparameter

Ebenfalls relevant für die Einschätzung der Leistungsfähigkeit des Herzens sind der LVSP (linksventrikulärer systolischer Druck) und der LVEDP (linksventrikulärer enddiastolischer Druck). Der LVEDP war bei beiden Gruppen mit induziertem

Myokardinfarkt im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich erhöht. Während die Kontrolltiere Werte von $2,5 \pm 0,6$ mmHg aufwiesen, ergaben die Messungen Werte von $32,2 \pm 2,8$ mmHg bei den mit Placebo therapierten CHF-Tieren und $33,0 \pm 4,7$ mmHg bei der HMR-Gruppe.

Der LVSP war mit 126 ± 4 mmHg bei den Placebo-Tieren und 127 ± 5 mmHg bei den HMR-Tieren im Vergleich zu 164 ± 8 mmHg in der Kontrollgruppe deutlich reduziert.

3.1.3 Weitere Messungen

Die Pulsraten in den Gruppen mit Tieren mit ausgeprägter Herzinsuffizienz waren mit 300 ± 9 /min in der CHF-Placebo-Gruppe bzw. 307 ± 8 /min in der CHF-HMR-Gruppe im Vergleich zu 336 ± 18 /min in der Kontrollgruppe deutlich erniedrigt. Verglichen mit den Tieren der Kontrollgruppe erhöht waren das Gewicht der Lungenflüssigkeit der herzinsuffizienten Tiere als Hinweis auf ein entstandenes Lungenödem (Kontrollgruppe 1495 ± 98 μ L, CHF-Placebo 3815 ± 397 μ L und CHF-HMR 3168 ± 407 μ L) und das Gewicht des rechten Ventrikels als Hinweis auf eine chronische Rechtsherzbelastung (Sham-Placebo 190 ± 10 mg, CHF-Placebo 400 ± 30 mg und CHF-HMR 320 ± 20 mg).

Hämodynamik und Globalparameter

	Sham Placebo	CHF Placebo	CHF HMR
N	13	14	10
MI Größe (%)	-	49±2	49±1
LVSP[mmHg]	164±8	126±4**	127±5**
LVEDP [mmHg]	2,5±0,6	32,2±2,8**	33,0±4,7**
dP/dtmax[1000*mmHg/s]	7037±323	3986±196**	4637±365**
dP/dtmin[1000*mmHg/s]	5553±217	3191±129**	3533±197**
Pulsrate [/min]	336±18	300±9	307±8
Gewicht Lungenwasser [µl]	1495±98	3815±397**	3169±407**
Rechter Ventrikel [mg]	190±10	400±30*	320±20* [#]
Körpergewicht [g]	470±12	461±11	462±9
Thrombozyten (*1000/µl)	742±24	705±20	705±21
MPV (fL)	6,39±0,04	6,53±0,07	6,52±0,06
Leukozyten (*1000/µL)	5,01±0,39	6,99±0,48*	7,79±0,67*
Monozyten (*1000/µL)	0,23±0,02	0,36±0,05**	0,40±0,04**
Neutrophile (*1000/µL)	0,38±0,04	0,86±0,13**	0,95±0,17**

Tabelle 2: Allgemeine Parameter der Herzinsuffizienz der Versuchstiere unter Placebo- oder Ataciguat-Therapie 10 Wochen nach Induktion des Myokardinfarktes und zum Vergleich die scheinoperierten Sham-Versuchstiere. LVSP, systolischer Druck im linken Ventrikel; LVEDP, linksventrikulärer enddiastolischer Druck, Mittelwerte ± S.E.M (standard error of the mean). * = $p < 0,05$ vs. Sham Placebo, ** = $p < 0,01$ vs. Sham Placebo, [#] = $p < 0,05$ vs. CHF Placebo

3.2 Gefäßfunktion

Die Analyse der Gefäßfunktion erfolgte, wie vorher beschrieben, durch die Versuche im Organbad und die Lucigenin-verstärkte Chemolumineszenz zur Detektion der Superoxidanionenbildung.

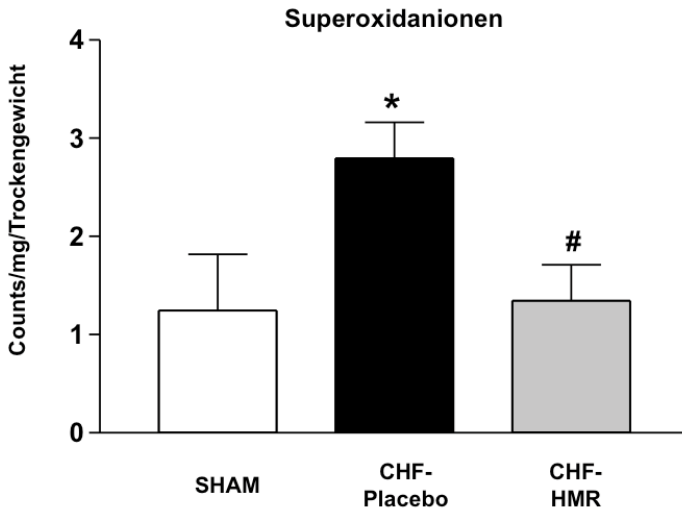


Abb. 4. Diese Grafik veranschaulicht die Messergebnisse der Lucigenin-verstärkten Chemolumineszenz. Die vaskuläre Superoxidanionenbildung in den Aortenabschnitten aller drei Versuchsgruppen wird hier vergleichend dargestellt als counts pro Minute pro mg Trockengewicht des Gewebes. Sham bezeichnet die Gruppe der scheinoperierten Tiere, CHF-Placebo die Tiere mit ausgeprägter Herzinsuffizienz ohne Therapie (* = $p < 0.05$ vs. Sham) und CHF-HMR die mit Ataciguat behandelte Gruppe ($\# = p < 0.05$ vs. CHF-Placebo).

3.2.1 Superoxidanionenproduktion

Wie in Abbildung 4 zu sehen, zeigten die Messungen der Lucigenin-verstärkten Chemolumineszenz eine signifikante Erhöhung der Superoxidanionenproduktion in den Aortenringen der Versuchstiere mit ausgeprägter Herzinsuffizienz im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren der Sham-Gruppe. Die mit Ataciguat therapierten Tiere zeigten eine erhebliche Verminderung der Superoxidanionenproduktion bis zur Normalisierung der Werte auf das Niveau der scheinoperierten Tiere.

3.2.2 Phenylephrin-induzierte Vasokonstriktion

Die Ergebnisse der Messungen im Organbad zur Überprüfung der Funktionstüchtigkeit des Endothels zeigten eine signifikante Erhöhung der Phenylephrin-abhängigen Vasokonstriktion sowohl bei den Placebo- als auch bei den Ataciguat-therapierten Versuchstieren mit Herzinsuffizienz (siehe Abbildung 5).

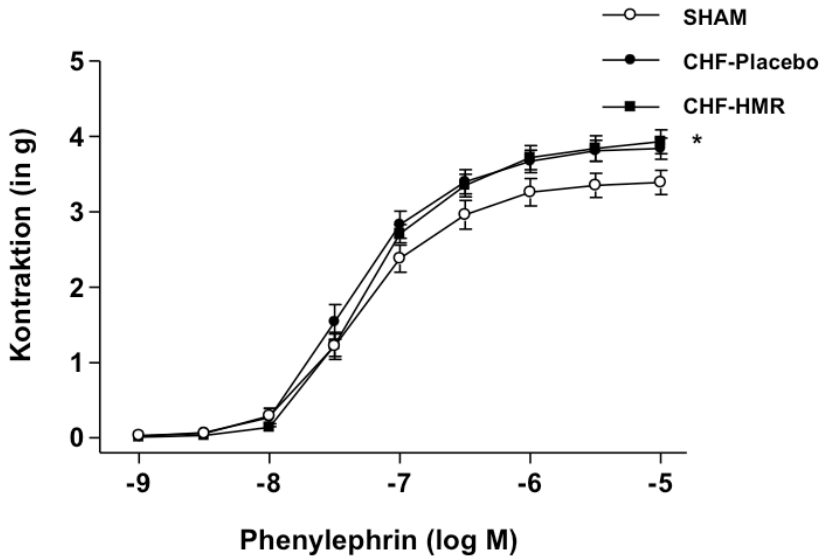


Abb. 5. Phenylephrin-abhängige Vasokonstriktion bei Versuchstieren mit Herzinsuffizienz und scheinoperierten Kontrolltieren. Die herzinsuffizienten Tiere wurden entweder mit einer Placebolösung (CHF-Placebo) oder dem sGC-Aktivator Ataciguat (CHF-HMR, 2x10mg/kg/Tag über Schlundsonde gegeben) behandelt. * $P < 0,05$ vs. Sham, $n = 10-16$.

3.2.3 Endothel-abhängige Relaxation auf Acetylcholin

Die kumulative Gabe von Acetylcholin erzeugte eine Endothel-abhängige Relaxation an den mit KCl angeregten und mit PE vorkontrahierten Aortensegmenten. Abbildung 6 zeigt die Dosis-Wirkungs-Kurven der drei Versuchsgruppen. Die Kalt-Wirkungskurve der scheinoperierten Tiere der Sham-Gruppe dient als Bezugscurve und stellt die normale Gefäßfunktion dar. Die Kurve der CHF-Placebo-Gruppe zeigt, dass die Relaxation der Aorta unter Placebothherapie verglichen mit der Bezugscurve erheblich verschlechtert ist, während unter Ataciguat-Therapie die Relaxation erheblich verbessert wird, ohne jedoch die Gefäßfunktion vollständig wiederherzustellen.

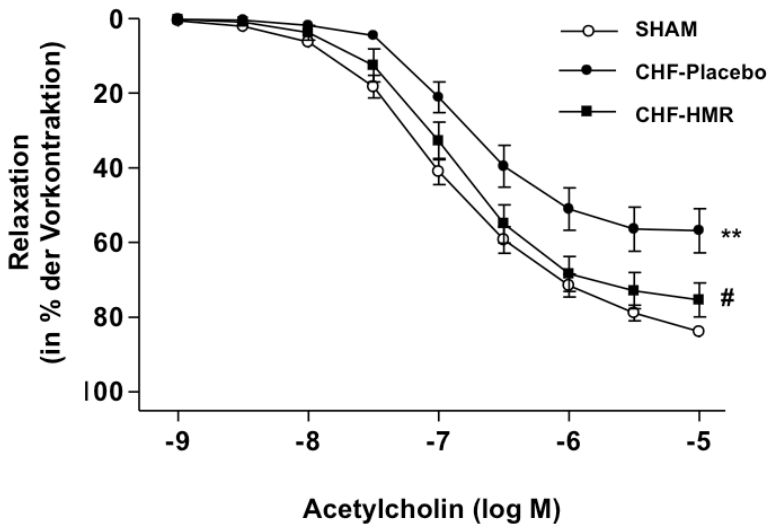


Abb. 6. Endothel-abhängige Relaxation auf Acetylcholin bei Versuchstieren mit Herzinsuffizienz und scheinoperierten Kontrolltieren. Die herzinsuffizienten Tiere wurden entweder mit einer Placebolösung (CHF-Placebo) oder dem sGC-Aktivator Ataciguat (CHF-HMR, 2x10mg/kg/Tag über Schlundsonde gegeben) behandelt. **P < 0,01 vs. Sham, #P < 0,05 vs. CHF-Placebo, n= 10-16.

3.2.4 Endothel-unabhängige Relaxation auf DEA-NONOate

Die endothelunabhängige Vasodilatation durch DEA-NONOate war bei den placebo-therapierten, herzinsuffizienten Tieren signifikant vermindert und durch die Ataciguat-Therapie deutlich erhöht (siehe Abbildung 7).

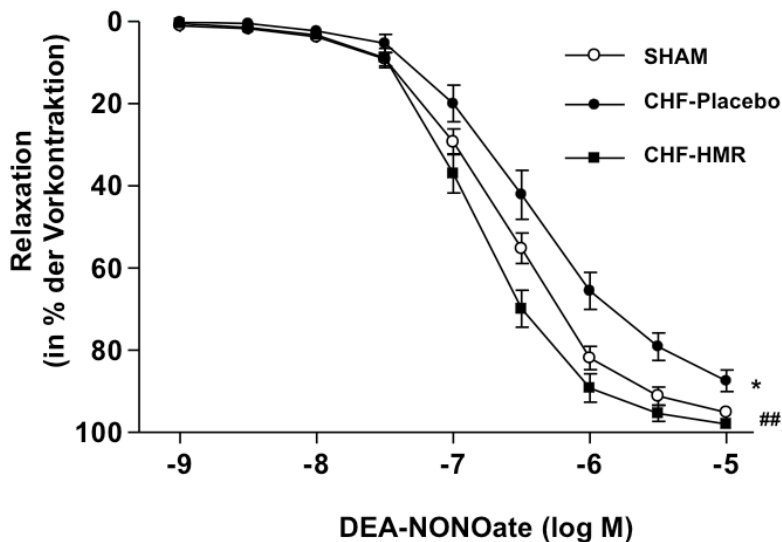


Abb. 7. Endothel-unabhängige Relaxation auf DEA-NONOate bei Versuchstieren mit Herzinsuffizienz und scheinoperierten Kontrolltieren. Die herzinsuffizienten Tiere wurden entweder mit einer Placebolösung (CHF-Placebo) oder dem sGC-Aktivator Ataciguat (CHF-HMR, 2x10mg/kg/Tag über Schlundsonde gegeben) behandelt. * $P < 0,05$ vs. Sham, ## $P < 0,01$ vs. CHF-Placebo, $n = 10-16$.

3.2.5 Inhibition der Abgabe von tonischem NO durch L-NNA

In den vorkontrahierten Aortenringen induzierte die Hemmung der tonischen NO-Synthese durch die Zugabe von L-NNA eine verminderte zusätzliche Kontraktion in den Tieren mit Herzinsuffizienz unter Placebothherapie. Dieser Aspekt weist auf eine reduzierte NO-Bioverfügbarkeit hin und wurde durch die Ataciguat-Therapie bis auf das Niveau der Kontrolltiere verbessert.

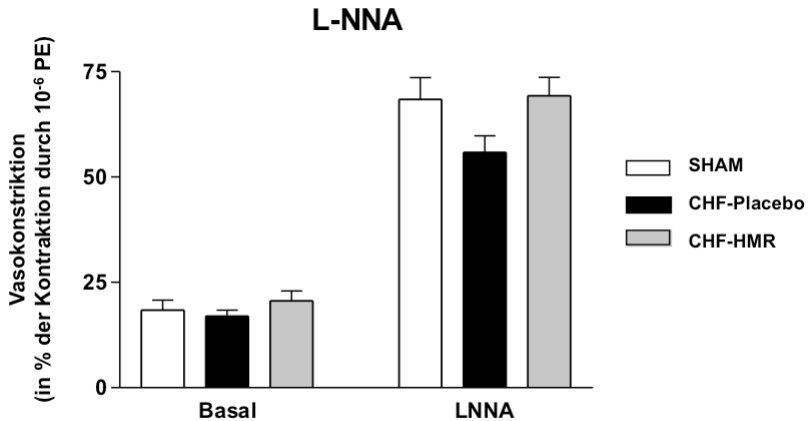


Abb. 8. Die Bioverfügbarkeit von NO wurde durch die zusätzliche Kontraktion nach Inhibierung der NO-Synthase mit N^G -Nitro-L-Arginin (L-NNA, 100 mmol/L) in vorkontrahierten Aortenringen von herzinsuffizienten Versuchstieren nach Herzinsuffizienz und 10-wöchiger medikamentöser Therapie ermittelt und mit den Sham-operierten Kontrolltieren verglichen. Die herzinsuffizienten Tiere wurden entweder mit einer Placebolösung (CHF-Placebo) oder dem sGC-Aktivator Ataciguat (CHF-HMR, $2 \times 10 \text{ mg/kg/Tag}$ über Schlundsonde gegeben) behandelt. * $P < 0,05$ vs. Sham, ## $P < 0,01$ vs. CHF-Placebo, $n = 10-16$.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der Tests der Gefäßfunktion eine eindeutige Einschränkung der Endothelfunktion bei den herzinsuffizienten Versuchstieren. Die Therapie mit Ataciguat verbesserte jeden der hier präsentierten Parameter der Endothelfunktion erheblich (siehe Tabelle 3).

Agonist	Sham Placebo	CHF Placebo	CHF HMR
Acetylcholin			
EC ₅₀ (nmol/L)	139,4 ± 23,3	182,7 ± 22,9	131,3 ± 15,5
R _{max} (%)	83,9 ± 1,4	56,9 ± 5,9**	75,4 ± 4,6 [#]
DEA-NONOate			
EC ₅₀ (nmol/L)	237,9 ± 31,9	424,6 ± 63,5*	170,1 ± 30,3 ^{##}
R _{max} (%)	95,2 ± 1,4	87,5 ± 2,6*	98,0 ± 1,0 ^{##}

Tabelle 3. Vasomotor-Funktion der Aortenringe von Versuchstieren mit ausgeprägter Herzinsuffizienz nach zehn Wochen medikamentöser Therapie mit Placebo oder dem sGC-Aktivator Ataciguat. Als Kontrollgruppe dienen scheinoperierte Tiere. EC₅₀, mittlere effektive Konzentration, R_{max}, maximale Relaxation, Mittelwerte ± S.E.M. *P < 0,05 vs. Sham, **P < 0,01 vs. Sham, #P < 0,05 vs. CHF-Placebo, ##P < 0,01 vs. CHF-Placebo.

3.3 VASP-Phosphorylierung und Thrombozytenaktivierung

Um die Effekte der medikamentösen Langzeittherapie mit Ataciguat auf die Thrombozytenfunktion zu beurteilen, wurden wie beschrieben verschiedene Aspekte der Thrombozyten-Inhibition und -Aktivierung ermittelt. Die VASP-Phosphorylierung in den Thrombozyten gilt als wichtiger regulatorischer Bestandteil der Inhibition der Aktivierung der Blutplättchen.

Die direkten Effekte von Ataciguat auf den NO/cGMP-Signalweges in den Thrombozyten wurden unabhängig von den übrigen Versuchen an zuvor unbehandelten Tieren der Kontrollgruppe gemessen. Hierfür wurde thrombozytenreiches Plasma der Versuchstiere *in vitro* mit Ataciguat (10µmol/L) stimuliert und anschliessend die Phosphorylierung gemessen. Der Versuch ergab eine erhebliche Stimulierung der VASP-Phosphorylierung nach Ataciguat-Gabe auf etwa 250% des Wertes in unstimuliertem Plasma (siehe Abbildung 9 A und C).

Neben dem *in vitro* Versuch wurde zur Bestimmung der basalen *in vivo*-VASP-Phosphorylierung in den Thrombozyten Vollblut in Formaldehyd fixiert und einmalig

Atacigat (10 mg/kg) appliziert. Das Ergebnis zeigte eine erhöhte Stimulierung der VASP-Phosphorylierung um etwa 25% verglichen mit den Messungen nach Applikation eines Placebos (siehe Abbildung 9 B und D).

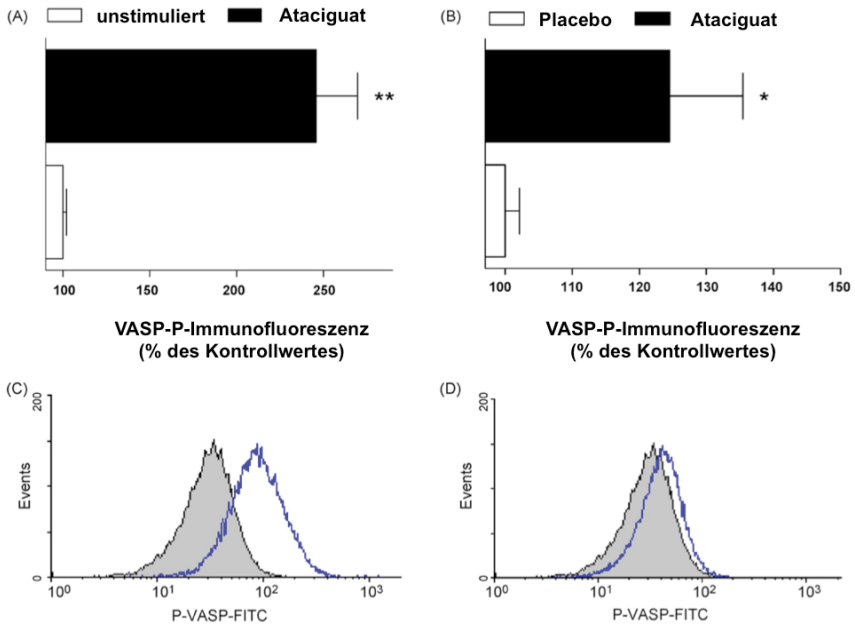


Abb. 9. VASP-Phosphorylierung in Thrombozyten nach *in vitro* Stimulation von Thrombozyten-reichem Plasma durch Gabe von 10 μ mol/l Atacigat verglichen mit unstimuliertem Kontrollwert (A). Therapie mit Atacigat (10 mg/kg, 2h, *in vivo*) erhöht die VASP-Phosphorylierung verglichen mit Placebothherapie (B). Die Ergebnisse sind in % von unstimulierter VASP-Phosphorylierung dargestellt, Mittelwerte \pm S.E.M von 5-7 Tieren, * $P < 0,05$ vs. Placebo, ** $P < 0,01$ vs. Unstimuliert.

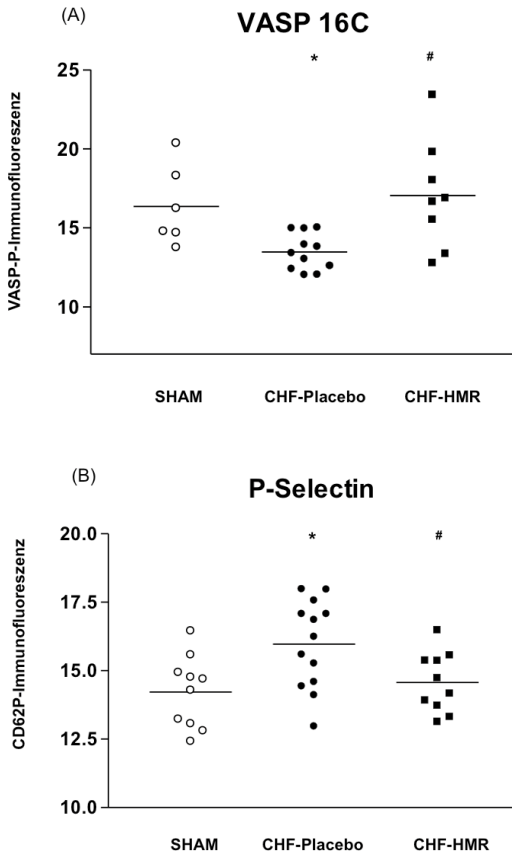


Abb. 10. Die Phosphorylierung des Vasodilatator-stimulierten Phosphoprotein (VASP) an Ser239 spiegelt die Funktionstüchtigkeit des NO/cGMP-Signalweges in den Thrombozyten wieder. Die Oberflächen-Expression von P-Selectin (CD62P) zeigt die Thrombozyten-Aktivierung. Beide Messungen erfolgten bei scheinoperierten Tieren (Sham) und Versuchstieren mit induziertem Myokardinfarkt und anschließender Herzinsuffizienz (CHF). Die herzinsuffizienten Tiere wurden zehn Wochen lang entweder mit einer Placebolösung (CHF-Placebo) oder dem sGC-Aktivator Ataciguat (CHF-HMR, 2 x 10 mg/kg/Tag über Schlundsonde gegeben) behandelt. Ergebnisse werden als mittlere Fluoreszenz \pm S.E.M von 8-12 unterschiedlichen Tieren dargestellt, * $P < 0,05$ vs. Sham, # $P < 0,05$ vs. CHF-Placebo, ## $P < 0,01$ vs. CHF-Placebo.

Die Funktion der Blutplättchen in den Langzeitexperimenten wurde über die NO-vermittelten Signalwege in den Thrombozyten beurteilt. Hier zeigte sich eine erheblich verminderte VASP-Phosphorylierung an Ser239 bei den Versuchstieren mit aus-geprägter Herzinsuffizienz und eine eindeutige Zunahme derselben unter chronischer Therapie mit Ataciguat (Siehe Abbildung 10 A).

Die in Abbildung 10 B dargestellten Ergebnisse zeigen die Messung der Thrombozytenaktivierung. Diese erfolgte über die Oberflächenexpression von P-Selectin (CD62P) und ergab eine verstärkte Expression bei den herzinsuffizienten Tieren, welche unter Ataciguat-Therapie rückläufig war.

4. Diskussion

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die chronische Aktivierung der sGC durch den direkten sGC-Aktivator Ataciguat im experimentellen Modell der Herzinsuffizienz die verschlechterte Gefäßfunktion erheblich verbessert. Zusätzlich wurde gezeigt, dass unabhängig vom hämodynamischen Status die Aktivierung der Thrombozyten reduziert werden konnte. Somit konnten sowohl Endothel-abhängige als auch Endothel-unabhängige Effekte der Therapie mit dem Anthranilinsäure-Derivat Ataciguat nachgewiesen werden.

Unter den Bedingungen der chronischen Herzinsuffizienz nach induziertem Myokardinfarkt entwickelten die Versuchstiere als Konsequenz der eingeschränkten linksventrikulären Funktion und der verminderten Schubspannung am Gefäßendothel eine progressive Endotheldysfunktion, die anhand der verminderten Bioverfügbarkeit von endogenem NO sichtbar wurde^{19-21,84, 85}. Hierbei gerät die Vasodynamik aus dem Gleichgewicht und es kommt zur reduzierten Bioverfügbarkeit des wichtigsten endothelialen Vasodilatators NO⁸⁶⁻⁸⁸. Zusätzlich führt das sogenannte eNOS-uncoupling zur Entkopplung des NO-synthetisierenden Enzymes (eNOS) im Gefäßendothel und somit zu einer vermehrten Synthese von reaktiven Sauerstoffradikalen^{89, 90}. Verschiedene neurohumorale Systeme dienen der Steuerung und Kontrolle der NO-Bioverfügbarkeit und der Bildung von Sauerstoffradikalen, welche einen erheblichen Einfluss auf die Verfügbarkeit von NO und die Endothelfunktion haben^{40, 47, 51, 52, 91}.

Diese neurohumoralen Systeme und die Beeinflussung der Endotheldysfunktion sind wichtige Ziele in den verschiedenen Ansätzen der aktuellen medikamentösen Therapie von Patienten mit Herzinsuffizienz oder verwandten Krankheitsbildern. Die Wirkung des NO ist jedoch nicht alleine ausschlaggebend für einen effektiven Eingriff in die Endothelfunktion. Um am Endothel wirksam sein zu können, muss die Häm-Verbindung der sGC in der nicht-oxidierten Form vorliegen^{65, 68}. Reaktive Sauerstoffradikale oxidieren die Häm-Verbindung und reduzieren somit die Verfügbarkeit und Funktionalität des NO auf dessen Grundaktivität. Oxidativer Stress durch die vermehrte Bildung von Sauerstoffradikalen beeinflusst die

Endothelfunktion und führt über verschiedene Mechanismen zur Verschlechterung der Gefäßfunktion und des Zustandes der Patienten. In der vorliegenden Studie erweitern wir frühere allgemeine Beobachtungen, nach denen Ataciguat die Bildung von Sauerstoffradikalen in den Aorten der herzinsuffizienten Versuchstiere deutlich verringert und die NO-Sensibilität der sGC in den Aorten stark verbessert ist, auf den Bereich der Herzinsuffizienz⁷².

Die Ergebnisse der Messungen zeigen eine Normalisierung der Produktion von Sauerstoffradikalen und somit eine deutliche Abnahme des oxidativen Stresses. Zusätzlich wurde die kontraktionsabhängige endotheliale NO-Abgabe normalisiert. Ob diese Effekte auf einer direkten anti-oxidativen Wirkung von Ataciguat oder auf einer indirekten Vermittlung durch positive Einflüsse auf ROS-synthetisierende Enzyme beruhen, lässt sich durch die in dieser Studie gewählten Versuche und Daten nicht ermitteln. Die Ergebnisse unserer Messungen bestätigen jedoch den Hinweis auf die Möglichkeit eines direkten Einflusses von Ataciguat auf die Häm-oxidierten Enzyme, welche die reaktiven Sauerstoffradikale generieren.

Zur Beurteilung der Gefäßfunktion verwendeten wir mehrere etablierte Methoden, welche in ihrer Gesamtheit eine gute Einschätzung der Gefäßfunktion ermöglichen. Neben der bereits erwähnten Messung der Konzentration der Superoxidanionen ermittelten wir die Endothel-abhängige und die Endothel-unabhängige Relaxation der Gefäße. Das Ungleichgewicht der vasokonstriktorischen und vasodilatatorischen Substanzen unter Bedingungen der Endotheldysfunktion hat erheblichen Einfluss auf die Funktionalität des Endothels und verändert somit dessen Reaktion auf bestimmte Situationen und Reize. Im Zustand der chronischen Herzinsuffizienz und der damit verbundenen starken Beeinträchtigung der Gefäßfunktion nehmen sowohl Endothel-abhängige als auch Endothel-unabhängige Vasodilatation erheblich ab. Unsere Messungen ergaben eine signifikante Verbesserung dieses Zustandes unter der Therapie mit Ataciguat.

Der Ansatz der Wiederherstellung der Gefäßfunktion zur Verbesserung der klinischen Situation der Patienten mit Herzinsuffizienz oder vergesellschafteten Krankheitsbildern spielt eine prägende Rolle bei den aktuellen Therapieansätzen. Unter der Therapie mit Ataciguat konnte eine deutliche Verbesserung der

Gefäßfunktion nachgewiesen werden. Wie bereits beschrieben spielt die Endotheldysfunktion eine Schlüsselrolle bei der chronischen Herzinsuffizienz, nicht nur als grundlegender pathologischer Mechanismus, sondern auch als klinischer Parameter für den Gesundheitszustand des Patienten, und erlaubt indirekt eine Prognose zu Verlauf und Outcome des Krankheitsbildes⁹²⁻⁹⁵.

Eine besondere Bedeutung gewinnen die Überlegungen des therapeutischen Potentials von Ataciguat durch den parallel zur Verbesserung der Gefäßfunktion nachweisbaren Einfluss auf die Funktion der Blutplättchen. Im Modell der chronischen Herzinsuffizienz zeigt die verminderte Bioverfügbarkeit von NO neben dem Einfluss auf die Gefäßfunktion ebenfalls einen Effekt auf die Funktion der Thrombozyten³¹. Hierbei kommt es über einen NO/cGMP-Signalweg in den Blutplättchen zu einer vermehrten Aktivierung der Thrombozyten. Wie bereits in mehreren vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden konnte, bewirkt diese Inhibition der genannten Signalkaskade die Aktivierung der Thrombozyten bereits nach kurzer Zeit^{74, 75, 96}. Die chronische Fehlfunktion des inhibitorischen Signalweges fördert die vermehrte Adhäsion der aktivierten Thrombozyten am Gefäßendothel und spielt eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von thromboembolischen Zwischenfällen und kardiovaskulären Komplikationen, welche erheblichen Einfluss auf Morbidität und Mortalität der unter einer Herzinsuffizienz leidenden Patienten haben.

Diese Effekte wurden bereits mehrfach vorbeschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurden sie im Zusammenhang mit den Vorgängen am Gefäßendothel beurteilt und erlauben eine präzisere Aussage über das Potential eines Therapieansatzes mit Ataciguat. Das Wissen um die grundlegende Bedeutung der NO-abhängigen Signalkaskade und deren Dysfunktion erlebte in den vergangenen Jahren einen erheblichen Zuwachs. Auf Grund des immensen therapeutischen Potentials in Hinsicht auf mehrere sogenannte Volkskrankheiten, die in unserer Gesellschaft eine prägende Rolle spielen, ist und bleibt der hier beschriebene Themenkomplex aktueller Gegenstand der Forschung.

Um Aussagen über die Langzeitwirkung der Ataciguattherapie machen zu können, wurden Experimente durchgeführt, welche bereits in verschiedenen anderen Studien Hinweise auf die Beeinflussung der beschriebenen Signalkaskade auf die Thrombo-

zytenfunktion lieferten. Als etablierter Marker^{81, 97, 98} für die Aktivierung der Thrombozyten wurde die VASP-Phosphorylierung in den Thrombozyten gemessen. In vitro und in vivo Versuche zeigten deutlich erhöhte Phosphorylierung der VASP und lieferten wie bereits einige vorangegangene Studien Hinweise, dass die Stimulierung der sGC in den Thrombozyten unabhängig von der sGC-Dysfunktion funktioniert⁷². Des Weiteren konnten wir bekräftigen, dass der inhibierende NO/cGMP-Signalweg in den Thrombozyten durch die chronische Therapie mit Atacigat verbessert werden konnte. Weitere Aussagekraft erlangten die Ergebnisse durch die Messung der Aktivierung der Thrombozyten anhand der Oberflächenexpression von P-Selektin. Das Adhäsionsmolekül P-Selektin deutet auf eine erhöhte Aktivierung der Blutplättchen und somit auf ihr gesteigertes Adhäsionspotential hin. Im Rahmen der Herzinsuffizienz noch deutlich erhöht, reduzierte die chronische Therapie mit Atacigat die Oberflächenexpression von P-Selektin. Bereits in anderen Studien wurde gezeigt, dass die in vivo Gabe von Atacigat die Sensitivität der Thrombozyten für exogenes NO verbesserte⁷³⁻⁷⁵.

Zusammengefasst erlauben die von uns durchgeführten Messungen an den Thrombozyten und die in vorangegangenen Studien erhobenen Daten eine relativ klare Einschätzung des Potentials der Beeinflussung der Thrombozytenaktivierung als therapeutischen Ansatzes.

Schlussfolgernd lässt sich aus der von uns durchgeführten Studie die Bekräftigung eines interessanten und möglicherweise effektiven Therapieansatzes der Herzinsuffizienz schließen. Die Beeinflussung der zentralen Pathomechanismen der Herzinsuffizienz war bereits Gegenstand vieler Studien und verschiedener Therapieansätze. Auch der Versuch der Verbesserung der cGMP-Signalkaskade ist bereits Teil der aktuellen Therapieschemata über die Inhibierung der PDE5-abhängigen cGMP-Degradierung. Die chronische Therapie mit Sildenafil als Beispiel dieses Therapieansatzes verbessert die Endothelfunktion, scheint kardioprotektive Wirkung zu haben und verbessert die körperliche Belastbarkeit der herzinsuffizienten Patienten⁹⁹⁻¹⁰¹. Unzweifelhaft handelt es sich bei der Beeinflussung des cGMP-Signalweges um ein vielversprechendes Ziel für weitere Forschung. Die direkte Aktivierung der cGMP-Signalkaskade beeinflusst direkt die Herzfunktion und weist zusätzlich Wirkungen auf sekundäre Pathomechanismen auf. Zu den sekundären

Pathomechanismen zählen die Endotheldysfunktion und die Aktivierung der Thrombozyten mit darauf folgendem erhöhtem Adhäsionspotential. Durch diese beiden Mechanismen führt die Aktivierung der cGMP-Signalkaskade zu einer Verbesserung der Endotheldysfunktion als zentrales Element der endothelialen Effekte sowie zu einer Beeinflussung der Thrombozytenaktivierung. Die beschriebenen Pathomechanismen sind auf unterschiedliche Weise und über unterschiedliche Vorgänge erheblich für die Komplikationen und die für den Gesundheitszustand der Patienten entscheidende Ausprägung des Krankheitsbildes verantwortlich. Gerade durch die Möglichkeit der parallelen Modifizierung zweier grundlegender Pathomechanismen ergibt sich ein hoffnungsvoller Therapieansatz.

Die Ergebnisse dieser Studie geben einen Einblick in das Potential des beschriebenen vielversprechenden Therapieansatzes. Da die Versuchsreihe auf Tierexperimenten bzw. künstlich geschaffenen Rahmenbedingungen basiert, kann keine vollständige Übertragbarkeit auf den tatsächlichen therapeutischen Einsatz von Ataciguat garantiert werden. Bei dem vorliegenden Wistar-Rattenmodell handelt es sich zwar um ein weit verbreitetes Versuchsmodell, jedoch bleiben limitierende Faktoren wie die Abhängigkeit von vorhandenen Techniken und Substanzen und die fehlerfreie Durchführung der Experimente. Bei der vorliegenden Arbeit wurden, um eine möglichst fundierte Aussage treffen zu können, mehrere unterschiedliche Faktoren durch etablierte Methoden bewertet. Logischerweise beschränkt sich die Aussagekraft der Ergebnisse dadurch aber auf diese repräsentativen Faktoren. Die Ergebnisse erheben deshalb nicht den Anspruch, eine ganzheitliche, endgültige Aussage treffen zu können. Weiterhin bleiben viele Mechanismen unverstanden. Daher erlaubt diese Arbeit zwar einen optimistischen Blick auf das therapeutische Potential der medikamentösen Aktivierung der sGC, beleuchtet jedoch nur einen Teil der Pathomechanismen.

Zwei wichtige Aspekte bleiben nach Abschluss dieser Arbeit ungeklärt und sind lohnenswerte Ansatzpunkte für weitere Arbeitshypothesen. Zum einen konnten wir in dieser Arbeit nicht eindeutig klären, ob die Abnahme des oxidativen Stresses am Gefäßendothel unter chronischer Therapie mit Ataciguat auf direkten anti-oxidative Eigenschaften Ataciguats oder der indirekten Beeinflussung von ROS-synthetisierenden Enzymen basiert. Eine Klärung dieser Frage war in der

vorliegenden Studie auf Grund der angewandten Methoden nicht möglich. Der zweite Ansatz beschäftigt sich mit den grundlegenden Mechanismen der Thrombozytenaktivierung. Während der direkte Zusammenhang der Thrombozytenaktivierung mit der NO-Bioverfügbarkeit mehrfach belegt werden konnte, besteht doch weiterhin Unklarheit über den genauen Hintergrund dieser Zusammenhänge.

Ein zunehmendes Verständnis der Grundlagen erlaubt eine immer präzisere Auseinandersetzung mit den molekularen Vorgängen und erschließt weitere Möglichkeiten für neue und oft vielversprechende Forschungsinhalte. Die beiden oben beschriebenen Ansätze könnten die bereits vorliegenden, verheißungsvollen Forschungsergebnisse für den Therapieansatz mit direkten sGC-Aktivatoren wie Ataciguat bekräftigen.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Studie befasst sich mit der medikamentösen Langzeittherapie der Endotheldysfunktion im Rahmen der klinisch manifesten Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt mit dem sGC-Aktivator Ataciguat.

Im Rahmen der chronischen Herzinsuffizienz nach abgelaufenem Myokardinfarkt kommt es als Folge der eingeschränkten linksventrikulären Funktion und der verminderten Schubspannung am Gefäßendothel zur Endotheldysfunktion. Die Vasodynamik gerät aus dem Gleichgewicht und führt zur erniedrigten Bioverfügbarkeit von NO, zur verminderten Expression des NO-synthetisierenden Enzyms (eNOS) und zur Entkopplung der eNOS. Dieses als „eNOS-uncoupling“ bekannte Phänomen führt zur vermehrten Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen, welche den oxidativen Stress auf das beschädigte Endothel erhöhen. Die reaktiven Sauerstoffradikale oxidieren zusätzlich in den glatten Muskelzellen die lösliche Guanylatzyklase und reduzieren somit die Vasodilatation.

Verschiedene neurohumorale Systeme beeinflussen das Gleichgewicht zwischen vasodilatativen und vasokonstriktiven Substanzen am Endothel und somit die Endothelfunktion. Diese neurohumeralen Systeme spielen wichtige Rollen in der aktuellen medikamentösen Therapie der chronischen Herzinsuffizienz und bieten zahlreiche verschiedene Therapieoptionen.

Ein relativ neuartiger Therapieansatz beinhaltet die medikamentöse Therapie mit sogenannten sGC-Aktivatoren, einer Wirkstoffklasse, die durch direkte Interaktion mit der löslichen Guanylatzyklase sowohl die Bildung von Sauerstoffradikalen verringert, als auch die NO-Sensibilität am Gefäßendothel verbessert. Hierzu gehört auch das in dieser Studie untersuchte Ataciguat.

Neben den direkten, „endothel-abhängigen“ Effekten am Gefäßendothel beeinflusst Ataciguat über die sogenannten „endothel-unabhängigen Effekte“ die Funktion der Blutplättchen, welche im Rahmen der Herzinsuffizienz durch die verminderte Bioverfügbarkeit von NO eine vermehrte Aktivierung und Adhäsion erfahren. Die

Folge sind erhöhte Risiken für thrombembolische Ereignisse und die Formation artherosklerotischer Läsionen. Ataciguat vermindert diese Risiken.

Mit den Ergebnissen dieser Studie konnten sowohl die endothel-abhängigen als auch die endothel-unabhängigen Effekte der medikamentösen Langzeittherapie mit Ataciguat im experimentellen Modell der chronischen Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt bestätigt werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Kannel WB, Belanger AJ. Epidemiology of heart failure. *Am Heart J*. 1991;121:951-957
2. Hodges P. Heart failure: Epidemiologic update. *Crit Care Nurs Q*. 2009;32:24-32
3. de la Fuente Cid R, Hermida Ameijeiras A, Pazo Nunez M, Lado Lado F. [epidemiology of heart failure. Ratio of epidemic]. *An Med Interna*. 2007;24:500-504
4. Comini L, Bachetti T, Gaia G, Pasini E, Agnoletti L, Pepi P, Ceconi C, Curello S, Ferrari R. Aorta and skeletal muscle no synthase expression in experimental heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 1996;28:2241-2248
5. Crouch MA. Chronic heart failure: Developments and perspectives. *Consult Pharm*. 2005;20:751-765
6. Genth S, Zotz R, Darius H, Treese N, Sigmund M, Hanrath P, Meyer J. [comparison of nyha classification with cardiopulmonary function in patients with chronic heart failure]. *Z Kardiol*. 1996;85:428-434
7. Swedberg K. Exercise testing in heart failure. A critical review. *Drugs*. 1994;47 Suppl 4:14-24
8. Belardinelli R, Georgiou D, Cianci G, Purcaro A. Randomized, controlled trial of long-term moderate exercise training in chronic heart failure: Effects on functional capacity, quality of life, and clinical outcome. *Circulation*. 1999;99:1173-1182
9. Cohn JN, Rector TS. Prognosis of congestive heart failure and predictors of mortality. *Am J Cardiol*. 1988;62:25A-30A
10. He J, Ogden LG, Bazzano LA, Vupputuri S, Loria C, Whelton PK. Risk factors for congestive heart failure in us men and women: Nhanes i epidemiologic follow-up study. *Arch Intern Med*. 2001;161:996-1002
11. Eriksson H, Wilhelmsen L, Caidahl K, Svardsudd K. Epidemiology and prognosis of heart failure. *Z Kardiol*. 1991;80 Suppl 8:1-6
12. Eriksson H, Svardsudd K, Larsson B, Ohlson LO, Tibblin G, Welin L, Wilhelmsen L. Risk factors for heart failure in the general population: The study of men born in 1913. *Eur Heart J*. 1989;10:647-656
13. Velagaleti RS, Vasan RS. Heart failure in the twenty-first century: Is it a coronary artery disease or hypertension problem? *Cardiol Clin*. 2007;25:487-495; v

14. Fleming I, Busse R. No: The primary edrf. *J Mol Cell Cardiol.* 1999;31:5-14
15. Busse R, Fleming I. Regulation of endothelium-derived vasoactive autacoid production by hemodynamic forces. *Trends Pharmacol Sci.* 2003;24:24-29
16. Drexler H, Hornig B. Endothelial dysfunction in human disease. *J Mol Cell Cardiol.* 1999;31:51-60
17. Katz SD, Hryniewicz K, Hriljac I, Balidemaj K, Dimayuga C, Hudaihed A, Yasskiy A. Vascular endothelial dysfunction and mortality risk in patients with chronic heart failure. *Circulation.* 2005;111:310-314
18. Fischer D, Rossa S, Landmesser U, Spiekermann S, Engberding N, Hornig B, Drexler H. Endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure is independently associated with increased incidence of hospitalization, cardiac transplantation, or death. *Eur Heart J.* 2005;26:65-69
19. Bauersachs J, Schafer A. Endothelial dysfunction in heart failure: Mechanisms and therapeutic approaches. *Curr Vasc Pharmacol.* 2004;2:115-124
20. Drexler H, Hayoz D, Munzel T, Just H, Zelis R, Brunner HR. Endothelial function in congestive heart failure. *Am Heart J.* 1993;126:761-764
21. Smith CJ, Sun D, Hoegler C, Roth BS, Zhang X, Zhao G, Xu XB, Kobari Y, Pritchard K, Jr., Sessa WC, Hintze TH. Reduced gene expression of vascular endothelial nitric oxide synthase and cyclooxygenase-1 in heart failure. *Circ Res.* 1996;78:58-64
22. Schafer A, Bauersachs J. Endothelial dysfunction, impaired endogenous platelet inhibition and platelet activation in diabetes and atherosclerosis. *Curr Vasc Pharmacol.* 2008;6:52-60
23. Bauersachs J, Bouloumie A, Fraccarollo D, Hu K, Busse R, Ertl G. Endothelial dysfunction in chronic myocardial infarction despite increased vascular endothelial nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase expression: Role of enhanced vascular superoxide production. *Circulation.* 1999;100:292-298
24. Bauersachs J, Fleming I, Fraccarollo D, Busse R, Ertl G. Prevention of endothelial dysfunction in heart failure by vitamin e: Attenuation of vascular superoxide anion formation and increase in soluble guanylyl cyclase expression. *Cardiovasc Res.* 2001;51:344-350
25. Arimura K, Egashira K, Nakamura R, Ide T, Tsutsui H, Shimokawa H, Takeshita A. Increased inactivation of nitric oxide is involved in coronary endothelial dysfunction in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;280:H68-75

26. Belch JJ, Bridges AB, Scott N, Chopra M. Oxygen free radicals and congestive heart failure. *Br Heart J*. 1991;65:245-248
27. Keith M, Geranmayegan A, Sole MJ, Kurian R, Robinson A, Omran AS, Jeejeebhoy KN. Increased oxidative stress in patients with congestive heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*. 1998;31:1352-1356
28. Forstermann U, Munzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: From marvel to menace. *Circulation*. 2006;113:1708-1714
29. Li H, Wallerath T, Forstermann U. Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type no synthase. *Nitric Oxide*. 2002;7:132-147
30. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288:373-376
31. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. An l-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:5193-5197
32. Alheid U, Frolich JC, Forstermann U. Endothelium-derived relaxing factor from cultured human endothelial cells inhibits aggregation of human platelets. *Thromb Res*. 1987;47:561-571
33. Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Munzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 2001;104:2673-2678
34. Munzel T, Afanas'ev IB, Kleschyov AL, Harrison DG. Detection of superoxide in vascular tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1761-1768
35. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: The role of oxidant stress. *Circ Res*. 2000;87:840-844
36. Milstien S, Katusic Z. Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: Implications for vascular endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;263:681-684
37. Laursen JB, Somers M, Kurz S, McCann L, Warnholtz A, Freeman BA, Tarpey M, Fukai T, Harrison DG. Endothelial regulation of vasomotion in apoe-deficient mice: Implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation*. 2001;103:1282-1288
38. Stroes E, Kastelein J, Cosentino F, Erkelens W, Wever R, Koomans H, Luscher T, Rabelink T. Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in hypercholesterolemia. *J Clin Invest*. 1997;99:41-46

39. Varin R, Mulder P, Tamion F, Richard V, Henry JP, Lallemand F, Lerebours G, Thuillez C. Improvement of endothelial function by chronic angiotensin-converting enzyme inhibition in heart failure : Role of nitric oxide, prostanoids, oxidant stress, and bradykinin. *Circulation*. 2000;102:351-356
40. Wollert KC, Drexler H. The renin-angiotensin system and experimental heart failure. *Cardiovascular research*. 1999;43:838-849
41. Carson PE. Rationale for the use of combination angiotensin-converting enzyme inhibitor/angiotensin ii receptor blocker therapy in heart failure. *Am Heart J*. 2000;140:361-366
42. Hornig B, Landmesser U, Kohler C, Ahlersmann D, Spiekermann S, Christoph A, Tatge H, Drexler H. Comparative effect of ace inhibition and angiotensin ii type I receptor antagonism on bioavailability of nitric oxide in patients with coronary artery disease: Role of superoxide dismutase. *Circulation*. 2001;103:799-805
43. Yan C, Kim D, Aizawa T, Berk BC. Functional interplay between angiotensin ii and nitric oxide: Cyclic gmp as a key mediator. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:26-36
44. Brown NJ, Vaughan DE. Angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Circulation*. 1998;97:1411-1420
45. Qi XL, Stewart DJ, Gosselin H, Azad A, Picard P, Andries L, Sys SU, Brutsaert DL, Rouleau JL. Improvement of endocardial and vascular endothelial function on myocardial performance by captopril treatment in postinfarct rat hearts. *Circulation*. 1999;100:1338-1345
46. Wiemer G, Linz W, Hatrik S, Scholkens BA, Malinski T. Angiotensin-converting enzyme inhibition alters nitric oxide and superoxide release in normotensive and hypertensive rats. *Hypertension*. 1997;30:1183-1190
47. Bachetti T, Comini L, Pasini E, Cargnoni A, Curello S, Ferrari R. Ace-inhibition with quinapril modulates the nitric oxide pathway in normotensive rats. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2001;33:395-403
48. Zhuo JL, Mendelsohn FA, Ohishi M. Perindopril alters vascular angiotensin-converting enzyme, at(1) receptor, and nitric oxide synthase expression in patients with coronary heart disease. *Hypertension*. 2002;39:634-638
49. Kobayashi N, Mori Y, Nakano S, Tsubokou Y, Kobayashi T, Shirataki H, Matsuoka H. Tcv-116 stimulates enos and caveolin-1 expression and improves coronary microvascular remodeling in normotensive and angiotensin ii-induced hypertensive rats. *Atherosclerosis*. 2001;158:359-368

50. Staessen J, Lijnen P, Fagard R, Verschueren LJ, Amery A. Rise in plasma concentration of aldosterone during long-term angiotensin ii suppression. *J Endocrinol.* 1981;91:457-465
51. Swedberg K, Eneroth P, Kjeksus J, Wilhelmssen L. Hormones regulating cardiovascular function in patients with severe congestive heart failure and their relation to mortality. Consensus trial study group. *Circulation.* 1990;82:1730-1736
52. Rocha R, Stier CT, Jr. Pathophysiological effects of aldosterone in cardiovascular tissues. *Trends Endocrinol Metab.* 2001;12:308-314
53. Farquharson CA, Struthers AD. Spironolactone increases nitric oxide bioactivity, improves endothelial vasodilator dysfunction, and suppresses vascular angiotensin i/angiotensin ii conversion in patients with chronic heart failure. *Circulation.* 2000;101:594-597
54. Laufs U, Gertz K, Huang P, Nickenig G, Bohm M, Dirnagl U, Endres M. Atorvastatin upregulates type iii nitric oxide synthase in thrombocytes, decreases platelet activation, and protects from cerebral ischemia in normocholesterolemic mice. *Stroke.* 2000;31:2442-2449
55. Wassmann S, Laufs U, Baumer AT, Muller K, Ahlborn K, Linz W, Itter G, Rosen R, Bohm M, Nickenig G. Hmg-coa reductase inhibitors improve endothelial dysfunction in normocholesterolemic hypertension via reduced production of reactive oxygen species. *Hypertension.* 2001;37:1450-1457
56. Delbosc S, Cristol JP, Descomps B, Mimran A, Jover B. Simvastatin prevents angiotensin ii-induced cardiac alteration and oxidative stress. *Hypertension.* 2002;40:142-147
57. Vecchione C, Brandes RP. Withdrawal of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors elicits oxidative stress and induces endothelial dysfunction in mice. *Circ Res.* 2002;91:173-179
58. Pliquett RU, Cornish KG, Peuler JD, Zucker IH. Simvastatin normalizes autonomic neural control in experimental heart failure. *Circulation.* 2003;107:2493-2498
59. Kjeksus J, Pedersen TR, Olsson AG, Faergeman O, Pyorala K. The effects of simvastatin on the incidence of heart failure in patients with coronary heart disease. *Journal of cardiac failure.* 1997;3:249-254
60. Mulsch A, Oelze M, Kloss S, Mollnau H, Topfer A, Smolenski A, Walter U, Stasch JP, Warnholtz A, Hink U, Meinertz T, Munzel T. Effects of in vivo nitroglycerin treatment on activity and expression of the guanylyl cyclase and cgm-p-dependent protein kinase and their downstream target vasodilator-stimulated phosphoprotein in aorta. *Circulation.* 2001;103:2188-2194

61. Alp NJ, Channon KM. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:413-420
62. Alp NJ, McAteer MA, Khoo J, Choudhury RP, Channon KM. Increased endothelial tetrahydrobiopterin synthesis by targeted transgenic gtp-cyclohydrolase i overexpression reduces endothelial dysfunction and atherosclerosis in apoe-knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:445-450
63. Alp NJ, Mussa S, Khoo J, Cai S, Guzik T, Jefferson A, Goh N, Rockett KA, Channon KM. Tetrahydrobiopterin-dependent preservation of nitric oxide-mediated endothelial function in diabetes by targeted transgenic gtp-cyclohydrolase i overexpression. *J Clin Invest.* 2003;112:725-735
64. Galle J, Zabel U, Hubner U, Hatzelmann A, Wagner B, Wanner C, Schmidt HH. Effects of the soluble guanylyl cyclase activator, yc-1, on vascular tone, cyclic gmp levels and phosphodiesterase activity. *Br J Pharmacol.* 1999;127:195-203
65. Evgenov OV, Pacher P, Schmidt PM, Hasko G, Schmidt HH, Stasch JP. No-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: Discovery and therapeutic potential. *Nature reviews. Drug discovery.* 2006;5:755-768
66. Boerrigter G, Costello-Boerrigter LC, Cataliotti A, Lapp H, Stasch JP, Burnett JC, Jr. Targeting heme-oxidized soluble guanylate cyclase in experimental heart failure. *Hypertension.* 2007;49:1128-1133
67. Boerrigter G, Costello-Boerrigter LC, Cataliotti A, Tsuruda T, Harty GJ, Lapp H, Stasch JP, Burnett JC, Jr. Cardiorenal and humoral properties of a novel direct soluble guanylate cyclase stimulator bay 41-2272 in experimental congestive heart failure. *Circulation.* 2003;107:686-689
68. Stasch JP, Schmidt PM, Nedvetsky PI, Nedvetskaya TY, H SA, Meurer S, Deile M, Taye A, Knorr A, Lapp H, Muller H, Turgay Y, Rothkegel C, Tersteegen A, Kemp-Harper B, Muller-Esterl W, Schmidt HH. Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels. *J Clin Invest.* 2006;116:2552-2561
69. Schindler U, Strobel H, Schonafinger K, Linz W, Lohn M, Martorana PA, Rutten H, Schindler PW, Busch AE, Sohn M, Topfer A, Pistorius A, Jannek C, Mulsch A. Biochemistry and pharmacology of novel anthranilic acid derivatives activating heme-oxidized soluble guanylyl cyclase. *Mol Pharmacol.* 2006;69:1260-1268

70. Klein M, Vogelsberger S, Schindler U, et al. Treatment with a nitric oxide independent activator of the soluble guanylyl cyclase dramatically improves monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Z Kardiol Suppl* 2005, Abst V910
71. Illiano SC, Riva L, Bouloy M, Beauverger P, O'Connor SE. Effect of HMR1766, a soluble guanylate cyclase activator, on differentiation of cardiac fibroblasts and extracellular matrix synthesis induced by TGFbeta. *Circulation* 2006, 114: Abst S281
72. Schäfer A, Flierl U, Kobsar A, Eigenthaler M, Ertl G, Bauersachs J. Soluble guanylyl cyclase activation with hmr1766 attenuates platelet activation in diabetic rats. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2006;26:2813-2818
73. Moro MA, Russel RJ, Celtek S, Lizasoain I, Su Y, Darley-USmar VM, Radomski MW, Moncada S. Cgmp mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide: Confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93:1480-1485
74. Hobbs AJ, Moncada S. Antiplatelet properties of a novel, non-no-based soluble guanylate cyclase activator, bay 41-2272. *Vascular pharmacology*. 2003;40:149-154
75. Friebe A, Mullershausen F, Smolenski A, Walter U, Schultz G, Koesling D. Yc-1 potentiates nitric oxide- and carbon monoxide-induced cyclic gmp effects in human platelets. *Mol Pharmacol*. 1998;54:962-967
76. Horstrup K, Jablonka B, Honig-Liedl P, Just M, Kochsiek K, Walter U. Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition. *Eur J Biochem*. 1994;225:21-27
77. Schäfer A, Burkhardt M, Vollkommer T, Bauersachs J, Munzel T, Walter U, Smolenski A. Endothelium-dependent and -independent relaxation and vasp serines 157/239 phosphorylation by cyclic nucleotide-elevating vasodilators in rat aorta. *Biochemical pharmacology*. 2003;65:397-405
78. Bearer EL, Prakash JM, Manchester RD, Allen PG. Vasp protects actin filaments from gelsolin: An in vitro study with implications for platelet actin reorganizations. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2000;47:351-364
79. Massberg S, Gruner S, Konrad I, Garcia Arguinzonis MI, Eigenthaler M, Hemler K, Kersting J, Schulz C, Muller I, Besta F, Nieswandt B, Heinzmann U, Walter U, Gawaz M. Enhanced in vivo platelet adhesion in vasodilator-stimulated phosphoprotein (vasp)-deficient mice. *Blood*. 2004;103:136-142

80. Massberg S, Sausbier M, Klatt P, Bauer M, Pfeifer A, Siess W, Fassler R, Ruth P, Krombach F, Hofmann F. Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine 3',5'-monophosphate kinase i. *The Journal of experimental medicine*. 1999;189:1255-1264
81. Oelze M, Mollnau H, Hoffmann N, Warnholtz A, Bodenschatz M, Smolenski A, Walter U, Skatchkov M, Meinertz T, Munzel T. Vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation as a sensitive monitor of defective nitric oxide/cgmp signaling and endothelial dysfunction. *Circulation research*. 2000;87:999-1005
82. Fleming I, Bauersachs J, Schäfer A, Scholz D, Aldershvile J, Busse R. Isometric contraction induces the ca²⁺-independent activation of the endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:1123-1128
83. Fraccarollo D, Widder JD, Galuppo P, Thum T, Tsikas D, Hoffmann M, Ruetten H, Ertl G, Bauersachs J. Improvement in left ventricular remodeling by the endothelial nitric oxide synthase enhancer ave9488 after experimental myocardial infarction. *Circulation*. 2008;118:818-827
84. Busse R, Fleming I. Endothelial dysfunction in atherosclerosis. *J Vasc Res*. 1996;33:181-194
85. Drexler H. Nitric oxide and coronary endothelial dysfunction in humans. *Cardiovasc Res*. 1999;43:572-579
86. Bouloumie A, Bauersachs J, Linz W, Scholkens BA, Wiemer G, Fleming I, Busse R. Endothelial dysfunction coincides with an enhanced nitric oxide synthase expression and superoxide anion production. *Hypertension*. 1997;30:934-941
87. Drexler H. Endothelial dysfunction: Clinical implications. *Prog Cardiovasc Dis*. 1997;39:287-324
88. Drexler H, Hornig B. Importance of endothelial function in chronic heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1996;27 Suppl 2:S9-12
89. Haywood GA, Tsao PS, von der Leyen HE, Mann MJ, Keeling PJ, Trindade PT, Lewis NP, Byrne CD, Rickenbacher PR, Bishopric NH, Cooke JP, McKenna WJ, Fowler MB. Expression of inducible nitric oxide synthase in human heart failure. *Circulation*. 1996;93:1087-1094
90. Habib F, Dutka D, Crossman D, Oakley CM, Cleland JG. Enhanced basal nitric oxide production in heart failure: Another failed counter-regulatory vasodilator mechanism? *Lancet*. 1994;344:371-373
91. Teerlink JR, Clozel M, Fischli W, Clozel JP. Temporal evolution of endothelial dysfunction in a rat model of chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 1993;22:615-620

92. Drexler H. Endothelium as a therapeutic target in heart failure. *Circulation*. 1998;98:2652-2655
93. Keith M, Geranmayegan A, Sole MJ, Kurian R, Robinson A, Omran AS, Jeejeebhoy KN. Increased oxidative stress in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 1998;31:1352-1356
94. Kubo SH, Rector TS, Bank AJ, Williams RE, Heifetz SM. Endothelium-dependent vasodilation is attenuated in patients with heart failure. *Circulation*. 1991;84:1589-1596
95. Lindsay DC, Jiang C, Brunotte F, Adamopoulos S, Coats AJ, Rajagopalan B, Poole-Wilson PA, Collins P. Impairment of endothelium dependent responses in a rat model of chronic heart failure: Effects of an exercise training protocol. *Cardiovasc Res*. 1992;26:694-697
96. Zhou Z, Pyriochou A, Kotanidou A, Dalkas G, van Eickels M, Spyroulias G, Roussos C, Papapetropoulos A. Soluble guanylyl cyclase activation by hmr-1766 (ataciguat) in cells exposed to oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;295:H1763-1771
97. Eigenthaler M, Nolte C, Halbrugge M, Walter U. Concentration and regulation of cyclic nucleotides, cyclic-nucleotide-dependent protein kinases and one of their major substrates in human platelets. Estimating the rate of camp-regulated and cgmp-regulated protein phosphorylation in intact cells. *Eur J Biochem*. 1992;205:471-481
98. Schäfer A, Wiesmann F, Neubauer S, Eigenthaler M, Bauersachs J, Channon KM. Rapid regulation of platelet activation in vivo by nitric oxide. *Circulation*. 2004;109:1819-1822
99. Guazzi M, Samaja M, Arena R, Vicenzi M, Guazzi MD. Long-term use of sildenafil in the therapeutic management of heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*. 2007;50:2136-2144
100. Kass DA, Champion HC, Beavo JA. Phosphodiesterase type 5: Expanding roles in cardiovascular regulation. *Circulation research*. 2007;101:1084-1095
101. Katz SD, Balidemaj K, Homma S, Wu H, Wang J, Maybaum S. Acute type 5 phosphodiesterase inhibition with sildenafil enhances flow-mediated vasodilation in patients with chronic heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*. 2000;36:845-851

Abkürzungen

ACE	-	Angiotensin-Converting Enzym
Ach	-	Acetylcholin
ATP	-	Adenosintriphosphat
ATII	-	Angiotensin 2
cAMP	-	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cgk	-	cGMP-abhängige Kinase
cGMP	-	Zyklisches Guanosinmonophosphat
CHF	-	Chronische Herzinsuffizienz
EDHF	-	endothel-derived hyperpolarizing factor
ENOS	-	Endotheliale NO-Synthase
GTP	-	Guanosintriphosphat
HEPES	-	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
KCl	-	Kaliumchlorid
LNNA	-	Nitroarginin
LVSP	-	Linksventrikulärer systolischer Druck
LVEDP	-	Linksventrikulärer enddiastolischer Druck
MPV	-	Thrombozytenvolumen
NO	-	Stickstoff-Monoxid
NYHA	-	New York Heart Association
ox-sGC	-	Oxygenierte Lösliche Guanylatzyklase
PBS	-	Phosphatgepufferte Salzlösung
PE	-	L-Phenylephrin
PDE-5	-	Phosphodiesterase 5
PGI2	-	Prostacyclin
p-IRAG	-	Phosphorylierte IP ₃ -Rezeptor-abhängige cGMP-Kinase
p-VASP	-	Phosphoryliertes Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein
RAAS	-	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROS	-	Reaktive Sauerstoffradikale
sGC	-	Lösliche Guanylatzyklase

Danksagung

Ich danke Herrn Dr. med. Andreas Schäfer für das Überlassen des Themas, für die hervorragende Betreuung und Unterstützung.

Für die gute Zusammenarbeit und die schöne gemeinsame Zeit bedanke ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden, die mich während des Medizinstudiums und bei dieser Arbeit unterstützt haben.

