

**Aus dem Institut für Physiologie
der Universität Würzburg**

Lehrstuhl I, Vegetative Physiologie

Vorstand: Professor Dr. med. Michaela Kuhn



**Die Wirkung von Sildenafil auf das kardiovaskuläre System
in zwei murinen Modellen der Myokardhypertrophie**

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Elisabeth Christiane Eder

aus München

Würzburg, November 2010

**Aus dem Institut für Physiologie
der Universität Würzburg**

Lehrstuhl I, Vegetative Physiologie

Vorstand: Professor Dr. med. Michaela Kuhn



**Die Wirkung von Sildenafil auf das kardiovaskuläre System
in zwei murinen Modellen der Myokardhypertrophie**

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Elisabeth Christiane Eder

aus München

Würzburg, November 2010

Referentin: Prof. Dr. med. Michaela Kuhn

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Stefan Frantz

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

04. Februar 2011

Die Promovendin ist Ärztin

Meinen Eltern gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Myokardhypertrophie	1
1.1.1 Definition.....	1
1.1.2 Klinische Bedeutung	1
1.1.3 Auslösende Mechanismen	2
1.1.4 Wege der zellulären Signaltransduktion in Kardiomyozyten.....	3
1.1.4.1 Signaltransduktion über G-Proteine	3
1.1.4.2 Mitogen-Aktivierte-Protein-Kinase Signalwege	4
1.1.4.3 Calcineurin	5
1.1.4.4 Chromatin-Remodeling	6
1.2 Zyklisches Guanosinmonophosphat als intrazellulärer Signalträger.....	6
1.2.1 Synthese und Abbau von zyklischem Guanosinmonophosphat.....	6
1.2.2 Effektoren und Signalwege von zyklischem Guanosinmonophosphat	8
1.2.2.1 Vasculäre Effekte von zyklischem Guanosinmonophosphat	9
1.2.2.2 Myokardiale Effekte von zyklischem Guanosinmonophosphat.....	11
1.3 Sildenafil	15
1.3.1 Pharmakokinetik und Wirkmechanismus	15
1.3.2 Phosphodiesterase 5A.....	16
1.3.3 Pharmakodynamik und Nebenwirkungen	18
1.4. Zielsetzung der Arbeit.....	19
2 Methodik	22
2.1 Tiere und Studiendesign.....	22
2.1.1 Studie zu den Effekten von Sildenafil in einem murinen Modell der	22
Herzhypertrophie nach Transverser Aortenkonstriktion	22
2.1.2 Studie zu den kardiovaskulären Effekten von Sildenafil an Mäusen mit.....	23
globaler Deletion des Guanylylzyklase-A Rezeptors.....	23
2.1.3 Behandlung von Mäusen zur Bestimmung der Plasmaspiegel von Sildenafil	25
2.2 Tierhaltung	25
2.3 Transverse Aortenkonstriktion.....	26
2.4 Echokardiographie.....	27

2.5 Plethysmographische Messung des arteriellen Blutdrucks an wachen Mäusen	30
2.6 Invasive Blutdruckmessungen an narkotisierten Tieren	32
2.7 Nekropsie	32
2.8 Histologische Analysen	33
2.8.1 Messung des linksventrikulären Kardiomyoztendurchmessers	34
2.8.2 Bestimmung des Kollagenfasergehaltes im linksventrikulären Gewebe	34
2.9 Western Blot	35
2.9.1 Homogenisierung des linksventrikulären Gewebes	35
2.9.2 Bestimmung des Proteingehaltes des linksventrikulären Gewebes	36
2.9.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	36
2.9.4 Detektion von Zielproteinen und Quantifizierung	37
2.10 Messung des zyklischen Guanosinmonophosphat-Gehaltes im Gewebe	38
2.10.1 Homogenisierung des Gewebes	38
2.10.2 Durchführung des Radioimmunoassays	39
2.11 Bestimmung der Plasmakonzentrationen von Sildenafil	40
2.12 Statistische Auswertung	40
3 Ergebnisse	42
3.1 Monitoring der Pharmakotherapie mit Sildenafil	42
3.1.1 Kontrolle der Pharmakonaufnahme über das Futter	42
3.1.2 Ergebnisse der exemplarischen Plasmaspiegelbestimmung	42
3.2 Studie 1: Effekte von Sildenafil in einem murinen Modell der Herzhypertrophie nach Transverser Aortenkonstriktion	43
3.2.1 Blutdruckmessungen und Nekropsiedaten	43
3.2.2 Echokardiographie	48
3.2.3 Histologische Analysen	53
3.2.3.1 Vermessung des Kardiomyozytendurchmessers als morphologisches Korrelat der Herzhypertrophie	53
3.2.3.2 Vermessung des Kollagenfasergehaltes als Maß für die kardiale Fibrosierung	54

3.2.4 Western Blot-Analysen zum Nachweis von phosphorylierten Extrazellulär Regulierten Kinasen 1 und 2 als an myokardialem Zellwachstum beteiligte Signalproteine	55
3.2.5 Western Blot-Analysen zum Nachweis von phosphoryliertem Troponin I als Zielprotein der Proteinkinase G I	56
3.2.6 Messung des zyklischen Guanosinmonophosphat-Gehaltes im Gewebe.....	57
3.2.6.1 Messung des zyklischen Guanosinmonophosphat-Gehaltes in linksventrikulärem Gewebe	57
3.2.6.2 Messung des zyklischen Guanosinmonophosphat-Gehaltes in pulmonalem Gewebe ...	58
3.3 Studie 2: Kardiovaskuläre Effekte von Sildenafil bei Mäusen mit globaler Deletion des Guanylylzyklase-A Rezeptors	59
3.3.1 Blutdruckmessungen und Nekropsiedaten	59
3.3.2 Echokardiographie.....	63
3.3.3 Histologische Analysen	68
3.3.3.1 Vermessung des Kardiomyozytendurchmessers als morphologisches Korrelat der Herzhypertrophie.....	68
3.3.3.2 Vermessung des Kollagenfasergehaltes als Maß für die kardiale Fibrosierung	69
3.3.4 Western Blot-Analysen zum Nachweis von phosphorylierten Extrazellulär Regulierten Kinasen 1 und 2 als an myokardialem Zellwachstum beteiligte Signalproteine	71
3.3.5 Western Blot-Analysen zum Nachweis von phosphoryliertem Troponin I als Zielprotein der Proteinkinase G I	72
3.3.6 Messung des zyklischen Guanosinmonophosphat-Gehaltes im Gewebe.....	73
3.3.6.1 Messung des zyklischen Guanosinmonophosphat-Gehaltes in linksventrikulärem Gewebe	73
3.3.6.2 Messung des zyklischen Guanosinmonophosphat-Gehaltes in pulmonalem Gewebe ...	73
4 Diskussion	75
4.1 Sildenafil hat keine antihypertrophen Effekte in einem murinen Modell der moderaten Herzhypertrophie nach Transverser Aortenkonstriktion.....	75
4.2 Die Plasmaspiegel von Sildenafil sind im therapeutischen Bereich.....	75
4.3 Sildenafil hat keine direkten antihypertrophen Effekte bei moderater Links- oder Rechtsherzhypertrophie.....	76
4.4 Sildenafil hat verschiedene Effekte auf funktionell kompensierte moderate Herzhypertrophie und dekompenzierte massive Herzhypertrophie	77

4.5 Sildenafil steigert bei moderater Herzhypertrophie in einem Modell nach Transverser Aortenkonstriktion die Tendenz zur Herzdysfunktion.....	80
4.6 Sildenafil hat an Mäusen mit globaler Deletion des Guanylyzyklase-A-Rezeptors für Atriales Natriuretisches Peptid leichte antihypertensive aber keine kardialen antihypertrophen Effekte	82
4.7 Fazit der Dissertation.....	85
5 Zusammenfassung	86
6 Anhang	89
6.1 Technische Geräte	89
6.2 Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	89
6.3 Verwendete Chemikalien.....	90
6.4 Verwendete Lösungen und Antikörper	92
6.4.1 Bei der Nekropsie und Organentnahme verwendete Lösungen	92
6.4.2 Lösungen für die Homogenisierung des Gewebes	92
6.4.3 Im Western Blot verwendete Lösungen	93
6.4.4 Im Western Blot verwendete Antikörper.....	95
6.4.5 Im Radioimmunoassay verwendete Lösungen.....	95
6.4.6 Gebrauchsfertige Lösungen.....	96
6.5 Verwendete Software.....	96
6.6 Abkürzungsverzeichnis	97
7 Literaturverzeichnis	99

Danksagung

Lebenslauf

1 Einleitung

1.1 Myokardhypertrophie

1.1.1 Definition

Myokardhypertrophie ist definiert als eine Volumen- und Größenzunahme des Herzens, die auf einer Größenzunahme postmitotischer Kardiomyozyten ohne zusätzliche Zellteilung beruht (Lorell und Carabello, 2000; Molkentin, 2000).

Die Größenzunahme des linken Ventrikels wird als konzentrisches oder exzentrisches Remodeling charakterisiert. Das konzentrische Wachstum, z. B. in Folge chronischer arterieller Hypertonie oder Aortenstenose, ist gekennzeichnet durch eine Zunahme des Kardiomyozytendurchmessers, woraus eine Zunahme der linksventrikulären Wandstärke auf Kosten der Kammergröße resultiert (Lorell und Carabello, 2000).

Volumenbelastung, z. B. durch Aortenklappeninsuffizienz, Mitralklappeninsuffizienz oder Anämie, initiiert ein exzentrisches Wachstum, wobei die prozentuale Steigerung der Kardiomyozytenlänge prominenter ist als die Zunahme des Durchmessers. Eine Kammerdilatation ist die Folge (Heineke und Molkentin, 2006).

Prinzipiell wird unterschieden zwischen einer durch Schwangerschaft, Wachstum und aerobes Training hervorgerufenen sogenannten physiologischen Myokardhypertrophie und einer pathologischen Hypertrophie (Heineke und Molkentin, 2006), deren Charakteristika im Weiteren behandelt werden.

Die pathologische Hypertrophie wird von einer Vermehrung der Extrazellulärmatrix begleitet, d. h. der Gehalt an Fibronektin und Kollagen steigt und es kommt zur Hyperplasie der Fibroblasten (Ritter und Neyses, 2003).

1.1.2 Klinische Bedeutung

Die Myokardhypertrophie stellt einen Adaptationsmechanismus des Herzens an erhöhte Druck- oder Volumenbelastung dar. Diese Belastung entsteht im Menschen durch eine Reihe von Krankheiten mit hoher Inzidenz: chronische arterielle Hypertonie,

Myokardinfarkt, Myokardischämie aufgrund Koronarer Herzkrankheit, Klappenfehler, dilatative, obstruktive sowie diabetische Kardiomyopathie und Myokarditis (Heineke und Molkentin, 2006).

Das Gesetz von Laplace ($Wandspannung = \frac{\text{transmurale Druck} \times \text{Radius}}{2 \times \text{Wanddurchmesser}}$) besagt, dass ein erhöhter Druck auf das System durch eine Verstärkung der Wanddicke ausgeglichen werden kann (Lorell und Carabello, 2000). Dieses Stadium bezeichnet man als kompensierte Herzhypertrophie. Übersteigt die Belastung die Kompensationsmechanismen des Körpers, droht die funktionelle Dekompensation. Auch deshalb ist die Myokardhypertrophie mit einer erhöhten Mortalität assoziiert (Yamazaki et al., 1998).

Typische Folgen der Herzhypertrophie sind außerdem ischämische Herzerkrankungen, Herzinsuffizienz, Arrhythmien und plötzliches Herzversagen.

1.1.3 Auslösende Mechanismen

Hypertrophie der Kardiomyozyten ist die zelluläre Reaktion auf biomechanische und neurohumorale Stimuli (Ruwhof und van der Laarse, 2000). Neurohumorale Mechanismen umfassen die endo- und parakrine Signalübertragung durch Hormone, Cytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren, z. B. Angiotensin II, Endothelin-1 und Katecholamine. Chronische hämodynamische Überbelastung des Herzens induziert mechanischen Stress in Form einer Dehnung oder Deformation des Muskelgewebes. Als Stresssensoren am Herzen fungieren vermutlich das an der Z-Scheibe des Muskels verankerte MLP (Muscle LIM Protein) und Melusin, welches mit Integrinen interagiert (Heineke und Molkentin, 2006). Integrine sind Transmembranrezeptoren, die die Extrazellulärmatrix mit dem Zytoskelett der Zelle an sogenannten Fokaladhäsionen verbinden (Ruwhof und van der Laarse, 2000).

Eine vereinfachende Übersicht über Signalwege, die zur Myokardhypertrophie führen, bietet Abbildung 1.

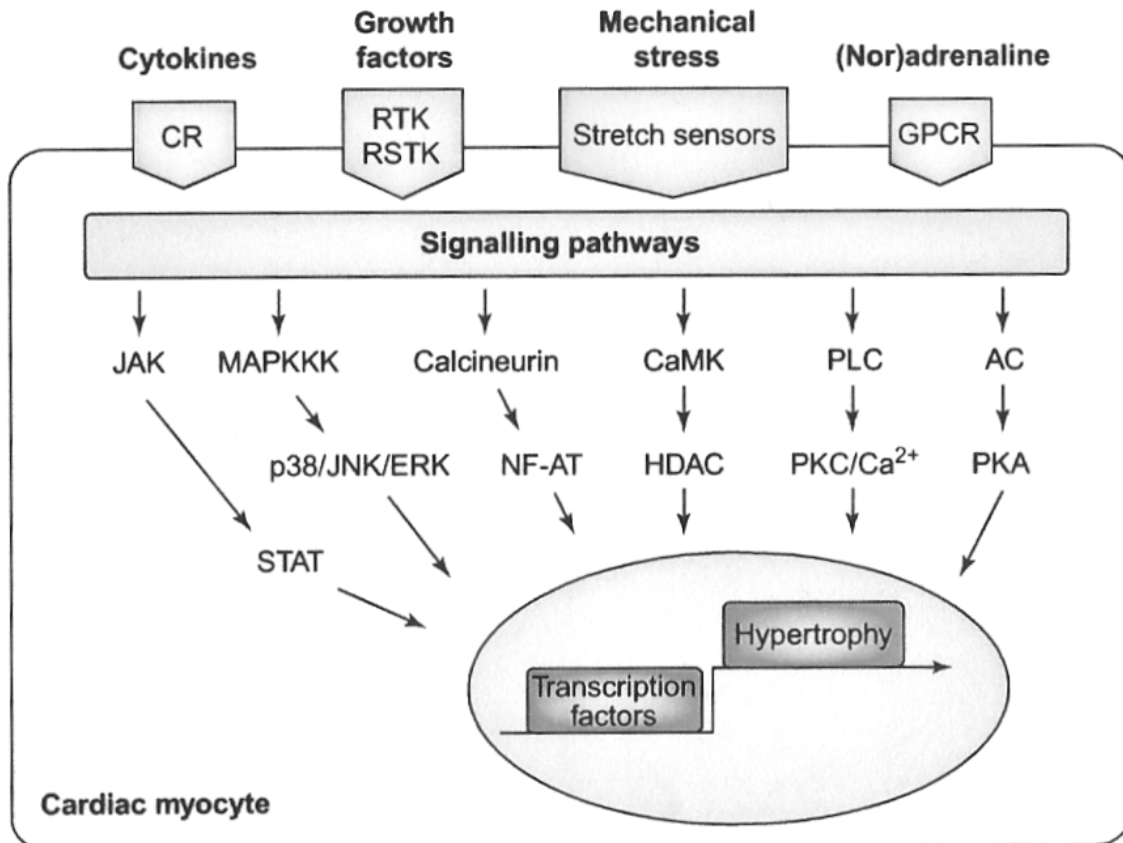


Abb. 1: Signalwege der Herzhypertrophie (Ritter und Neyses, 2003).

Hier werden Signalwege, die zur Hypertrophie des Kardiomyozyten führen, aufgezeigt. Verschiedene Stimuli aktivieren Cardiotrophin-Rezeptoren (CR), Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK), Rezeptor-Serin-Tyrosin-Kinasen (RSTK), Stresssensoren und G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) und führen über Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zum vermehrten Wachstum des Kardiomyozyten.

1.1.4 Wege der zellulären Signaltransduktion in Kardiomyozyten

1.1.4.1 Signaltransduktion über G-Proteine

Die Signaltransduktion am Herzen erfolgt unter anderem durch sogenannte „kleine“ und heterotrimere Guanin-Nucleotid-bindende Proteine (G-Proteine). Kleine G-Proteine der Ras und Rho-Familie sind in zelluläre Prozesse involviert, die zur Phosphorylierung nukleärer Transkriptionsfaktoren (z. B. c-jun, c-myc, Elk1, ATF 2) führen. Dabei interagieren sie mit den Signalwegen der Mitogen-Aktivierte-Protein-Kinase-Familie

(MAPK), indem Ras Extrazellulär Regulierte Kinasen (ERK) und c-junktionale NH₂-terminale Kinase (JNK) Signalwege reguliert und Rho JNK und p38 stimuliert (Ruwhof und van der Laarse, 2000).

Heterotrimere G-Proteine sind an Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen gekoppelt. Am ventrikulären Myokard sind folgende Rezeptoren von Bedeutung: mit G_{αs}-gekoppelte β-Adrenozeptoren, G_{αi}-gekoppelte Rezeptoren und an G_{αq} gekoppelte Rezeptoren. Letztere werden durch Angiotensin II, Endothelin-1 und Katecholamine aktiviert. Für γ_s-Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine konnte eine Kolo-kalisation mit den oben genannten Fokaladhäsionen nachgewiesen werden (Hansen et al., 1994). Damit könnten die heterotrimeren G-Proteine als Sensoren für mechanischen Stress im Herzen fungieren. Ebenso impliziert die in Abbildung 4 (Seite 14) dargestellte Öffnung von Transienten Rezeptorpotential-Kanälen vom „Canonical-Typ“ (TRCP) durch G_{αq}-Rezeptoren eine Funktion als Stresssensor des Myokards (Sharif-Naeini et al., 2009).

1.1.4.2 Mitogen-Aktivierte-Protein-Kinase Signalwege

MAPK-Signalwege spielen eine zentrale Rolle bei der Ausbildung einer Myokardhypertrophie. MAPKs werden in drei Subfamilien eingeteilt: p38, JNKs und ERKs.

Die MAPK Signalkaskade wird beispielsweise über Ligandenbindung an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR), Tyrosin-Kinase-Rezeptoren, Serin-Threonin-Kinasen, Cardiotrophin-1 (ein Zytokin) und Stressestimuli initiiert. Aktivierung dieser Signalwege führt zu Phosphorylierungskaskaden von Kinasen, die für eine finale Phosphorylierung und Aktivierung von p38, JNK und ERK verantwortlich sind. Dies bewirkt wiederum eine Phosphorylierung vieler intrazellulärer Zielproteine und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wodurch Gene, die das Wachstum der Kardiomyozyten induzieren und akzelerieren, hochreguliert werden (Molkentin, 2000; Muslin, 2008).

1.1.4.3 Calcineurin

Mechanischer Stress und Aktivierung von $G_{\alpha q}$ -gekoppelten Rezeptoren führen zu einer Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels, wodurch Calcineurin, eine im Zytosol lokalisierte Ca^{2+} -abhängige, durch Calmodulin regulierte Serin-Threonin-Phosphatase, aktiviert wird (Fiedler und Wollert, 2004; Zobel et al., 2007). Die Herkunft des Ca^{2+} , das zur Aktivierung von Calcineurin führt, ist noch umstritten. Wahrscheinlich ist ein Einstrom über L-Typ Ca^{2+} -Kanäle (Kato et al., 2000), oder aber über Transiente Rezeptorpotential-Kanäle vom „Canonical-Typ“ (Watanabe et al., 2009). Möglich ist aber auch eine Kopplung und Interaktion dieser Kanäle. Eine Aktivierung von TRPC kann hierbei zur Depolarisation führen, welche L-Typ Ca^{2+} -Kanäle aktiviert (Soboloff et al., 2005). Calcineurin wirkt wachstumsfördernd auf Herzmuskelzellen, indem es eine Reihe von Transkriptionsfaktoren reguliert. Dabei kommt insbesondere der Gruppe der NFAT-Transkriptionsfaktoren (Nuclear Factor of Activated T-Cells) eine große Bedeutung zu. Sie werden durch Calcineurin dephosphoryliert. Anschließend werden die im Myokard exprimierten Faktoren NFAT c_1 bis c_4 in den Zellkern transloziert und bewirken dort die Genexpression von Ca^{2+} -induzierbaren Genen, die das Zellwachstum anregen (Bueno et al., 2002; Fiedler und Wollert, 2004). Für die erfolgreiche Transkription wachstumsfördernder Proteine ist es zusätzlich nötig, das Ausschleusen der Transkriptionsfaktoren aus dem Zellkern zu hemmen (Wilkins und Molkentin, 2002). Eine Rephosphorylierung der Transkriptionsfaktoren erfolgt durch Mitglieder der MAPK Familie: GSK3 β (Glycogen-Synthase-Kinase 3 β), p38 und JNK. Die Phosphorylierung katalysiert eine Ausschleusung der Transkriptionsfaktoren durch „Chromosome Region Maintenance Protein 1“ Crm-1 (Bueno et al., 2002). Crm-1 ist ein „Exportprotein“, welches die durch „nukleäre Exportsignale“ stimulierte Ausschleusung von NFAT aus dem Zellkern mediiert (Gomez et al., 2003). Calcineurin hemmt wiederum Crm-1 (Zhu und McKeon, 1999) und sorgt damit für eine suffiziente Synthese von wachstumsfördernden Proteinen. Diese wird durch ein Sinken des Calciums und eine damit verbundene Inaktivierung von Calcineurin terminiert (Molkentin, 2000). Calcineurin kann auch direkt den Myozyten-Elongationsfaktor 2 (MEF 2), Proteinkinase C (PKC) sowie JNK aktivieren (Fiedler et al., 2002). Es wird angenommen, dass weitere direkte Effektoren des Calcineurins existieren. Diese sind Gegenstand intensiver Forschung (Wilkins und Molkentin, 2002).

1.1.4.4 Chromatin-Remodeling

Aufgrund der Komplexität eukaryontischer DNA bedarf es eines komplexen Komprimierungssystems. Hierbei sorgen Histon-Deacetylasen (HDAC) im Gegensatz zu Histon-Acetyl-Transferasen (HAT) für eine Kondensation des Chromatins und damit für einen Verlust der transkriptionellen Aktivität (Heineke und Molkentin, 2006). HDAC5 ist im Herzen an den Myozyten-Elongationsfaktor 2 gebunden und inhibiert dadurch dessen transkriptionelle Aktivität. Ein Anstieg des zytosolischen Ca^{2+} in Kernnähe führt zur Aktivierung von Calmodulinkinase (CaMK) und damit zur Phosphorylierung von HDAC5, wodurch letzteres aus dem Kern exportiert wird. Daraus resultiert eine Aktivierung von MEF 2, welches mit NFAT und GATA-Transkriptionsfaktoren interagiert und dadurch zur Expression zellwachstumsfördernder Gene führt (Maier, 2005).

Des Weiteren existieren Signalwege wie z. B. die JAK / STAT Kaskade (JAK: Janus-Kinase, STAT: Signal-Transducers and Activators of Transcription), die zur Herzhypertrophie führen.

1.2 Zyklisches Guanosinmonophosphat als intrazellulärer Signalträger

1.2.1 Synthese und Abbau von zyklischem Guanosinmonophosphat

Zyklisches 3`5`-Guanosin-Monophosphat (cGMP) ist ein ubiquitär intrazellulärer Signalträger, der die Funktionen fast aller Körperzellen moduliert. Hier soll ausschließlich die Bedeutung dieses Signalträgers im kardiovaskulären System kurz geschildert werden. In Kardiomyozyten und glatten Gefäßmuskelzellen wird cGMP auf mindestens drei Wegen aus Guanosintriphosphat (GTP) synthetisiert.

Zum einen erfolgt die Synthese durch Aktivierung der partikulären, membranständigen Guanylylzyklase A (GC-A) durch Atriales Natriuretisches Peptid (ANP) oder „B-Typ“ Natriuretisches Peptid (BNP) und der Guanylylzyklase B (GC-B), durch „C-Typ“ Natriuretisches Peptid (CNP) (Feil et al., 2003; Lohmann et al., 1997).

Zum anderen wird über neuronale, endotheliale oder induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) NO synthetisiert, welches die lösliche, vorwiegend zytosolisch lokalisierte Guanylylzyklase (sGC) aktiviert. Diese wiederum synthetisiert aus GTP cGMP (Potter et al., 2006). Abbildung 2 bietet eine Übersicht über die Synthese sowie Hydrolyse von cGMP.

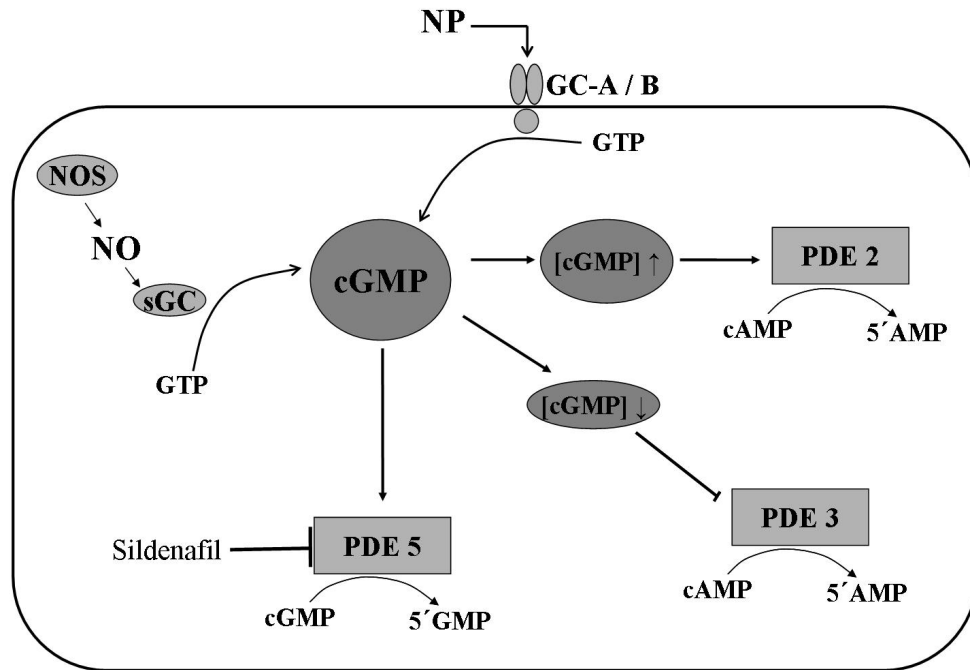


Abb. 2: Vereinfachte Darstellung der Synthese und Hydrolyse von cGMP und dessen Einflüsse auf die Hydrolyse von cAMP im kardiovaskulären System

Im kardiovaskulären System wird cGMP unter anderem über membranständige, durch Natriuretische Peptide (NP) aktivierte, Guanylylzyklase-A oder -B (GC-A / GC-B) synthetisiert. Des Weiteren wird über Stickstoffmonoxidsynthase (NOS) Stickstoffmonoxid (NO) synthetisiert und dadurch die lösliche Guanylylzyklase (sGC) aktiviert. Die Guanylylzyklasen spalten Pyrophosphat von Guanosintriphosphat (GTP) ab und führen damit zur Bildung von cGMP. CGMP aktiviert Phosphodiesterase 5 (PDE 5), die cGMP zu 5`Guanosinmonophosphat (5`GMP) abbaut. Dieser Abbau kann durch Sildenafil gehemmt werden. Niedrige intrazelluläre cGMP-Konzentrationen ([cGMP]↓) führen zu einer Hemmung der PDE 3, woraus ein Anstieg des zellulären zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP) resultiert. Hohe Konzentrationen von cGMP ([cGMP]↑) aktivieren PDE 2, woraus ein Abbau des cAMP zu 5`Adenosinmonophosphat (5`AMP) resultiert.

Für die Synthese des cGMP werden zumindest in Kardiomyozyten verschiedene funktionelle zelluläre Kompartimente postuliert (Castro et al., 2006; Piggott et al., 2006). Während die partikuläre GC membranständig ist und das über Natriuretische Peptide (NP) generierte cGMP daher an der Membran lokalisiert ist, entsteht diffus im Zytosol lokalisiertes cGMP durch die Aktivierung der sGC.

Der Abbau von cGMP zu 5`GMP in der Zelle erfolgt durch cGMP-hydrolysierende Phosphodiesterasen (PDE) (Feil et al., 2003). Dabei beeinflusst cGMP auch die Hydrolyse von zyklischem 3`5`-Adenosin-Monophosphat (cAMP) durch PDE 2 und PDE 3. Somit kann der intrazelluläre cGMP-Gehalt die Hydrolyse des cAMPs regulieren. Niedrige Konzentrationen von cGMP führen zu einer Hemmung der PDE 3, woraus ein Anstieg des cAMP resultiert. Hohe Konzentrationen an cGMP führen zur Aktivierung der PDE 2, wodurch wiederum cAMP abgebaut wird (Surapisitchat et al., 2007). Dies zeigt, dass cGMP als intrazellulärer Signalträger wiederum andere Signalträger (cAMP) beeinflusst. Der Abbau von cGMP durch PDE 5 wird unter 1.3.2 geschildert.

1.2.2 Effektoren und Signalwege von zyklischem Guanosinmonophosphat

Im kardiovaskulären System wurden bislang drei Klassen von Zielproteinen des cGMPs identifiziert: cGMP-abhängige Proteinkinase I (PKG I), Phosphodiesterasen und zyklische Nukleotid-gesteuerte Kanäle (CNG) (Feil et al., 2003; Lohmann et al., 1997). CNG umfassen eine Gruppe von nicht selektiven Kationenkanälen, die für monovalente Kationen permeabel sind und auch direkt durch die Bindung von cGMP oder cAMP aktiviert werden können. Entdeckt wurden sie in ihrer Funktion als Beteiligte an der Signalübertragung von Seh- und Geruchsprozessen (Biel et al., 1994; Kaupp und Seifert, 2002). Mittlerweile gelang es auch, die CNG in Endothel und glatter Gefäßmuskulatur (Yao et al., 1999), der Lunge, sowie in Herz, Hoden und Niere nachzuweisen (Biel et al., 1994; Ruiz et al., 1996).

Zudem ist möglich, dass cGMP in hohen Konzentrationen Einfluss auf die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) nimmt (Feil et al., 2003). Weitere Effektoren wurden bislang noch nicht identifiziert.

1.2.2.1 Vaskuläre Effekte von zyklischem Guanosinmonophosphat

Im Gefäßsystem ist ein wichtiges Zielprotein des cGMPs die PKG I. Deren Aktivierung führt zur Vasodilatation. Dies bedeutet ein Sinken des Gefäßwiderstandes im arteriellen Schenkel des Kreislaufs, was ein Sinken der Nachlast des Herzens bewirkt. Der systemische und pulmonale Blutdruck wird wesentlich über den Gefäßwiderstand in Arterien und Arteriolen reguliert und sinkt daher bei einer cGMP-vermittelten Vasodilatation (Barbee et al., 1994).

Diese Vasodilatation wird durch Erniedrigung des zytosolischen Calciumgehaltes erreicht. Die Senkung des Calciumspiegels wird durch Aktivierung oder Hemmung mehrerer intrazellulärer Signalwege vermittelt. Dabei sind im Folgenden beschriebene Effektoren der PKG I involviert. Die Inhibition des Inositoltriphosphat-Rezeptors (IP₃R) durch Phosphorylierung des „Inositoltriphosphat-Rezeptor-assoziierten-PKG-Substrates“ (IRAG) und Aktivierung der Sarkoplasmatischen-Reticulum-ATPase (SERCA) über eine Phosphorylierung von Phospholamban (PLB) führt zu einer vermehrten Speicherung von Calcium (Ca²⁺) im Sarkoplasmatischen Reticulum. Daraus resultiert eine Erniedrigung des intrazellulären Calciumgehaltes (Feil et al., 2003).

Die Aktivierung von Calcium-abhängigen Kaliumkanälen (BK_{ca}) durch PKG I führt zur Hyperpolarisation der Zellmembran und damit zu einem verringerten Einstrom von Calcium durch L-Typ Calcium-Kanäle (Lohmann et al., 1997). Die PKG I hemmt diesen L-Typ Calcium-Kanal auch direkt. Durch Phosphorylierung der Myosin-Leichtketten-Phosphatase (MLCP) wiederum werden die Myosin-Leichtketten dephosphoryliert. Die Ca²⁺-Sensitivität des kontraktile Apparates nimmt ab (Potter et al., 2006).

Aufgrund der oben geschilderten Effekte von cGMP auf die glatte Gefäßmuskulatur, ist es nicht verwunderlich, dass Mäuse mit einer globalen Deletion des GC-A Rezeptors unter anderem durch eine chronische arterielle Hypertonie sowie eine Myokardhypertrophie auffallen (Lopez et al., 1995). Eine selektive Deletion des GC-A Rezeptors in der Gefäßmuskulatur führt unter Ruhebedingungen im Organismus nicht zu der erwarteten arteriellen Hypertonie (Holtwick et al., 2002). Dies erklärt sich durch eine kompensatorische Erhöhung des über NO-generierten cGMPs und spiegelt sich auch in einer gesteigerten vasodilatativen Antwort auf NO wieder (Sabrane et al., 2003).

Die hypotensiven, hypovolämischen Effekte des durch ANP synthetisierten cGMPs werden auch über eine Steigerung der endothelialen Permeabilität verursacht (Sabrane et al., 2005).

Zusätzlich wird vermutet, dass eine cGMP-vermittelte Aktivierung der PKG I die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen hemmt (Lincoln et al., 2006).

Abbildung 3 bietet eine Übersicht über die zur Vasodilatation führenden Mechanismen.

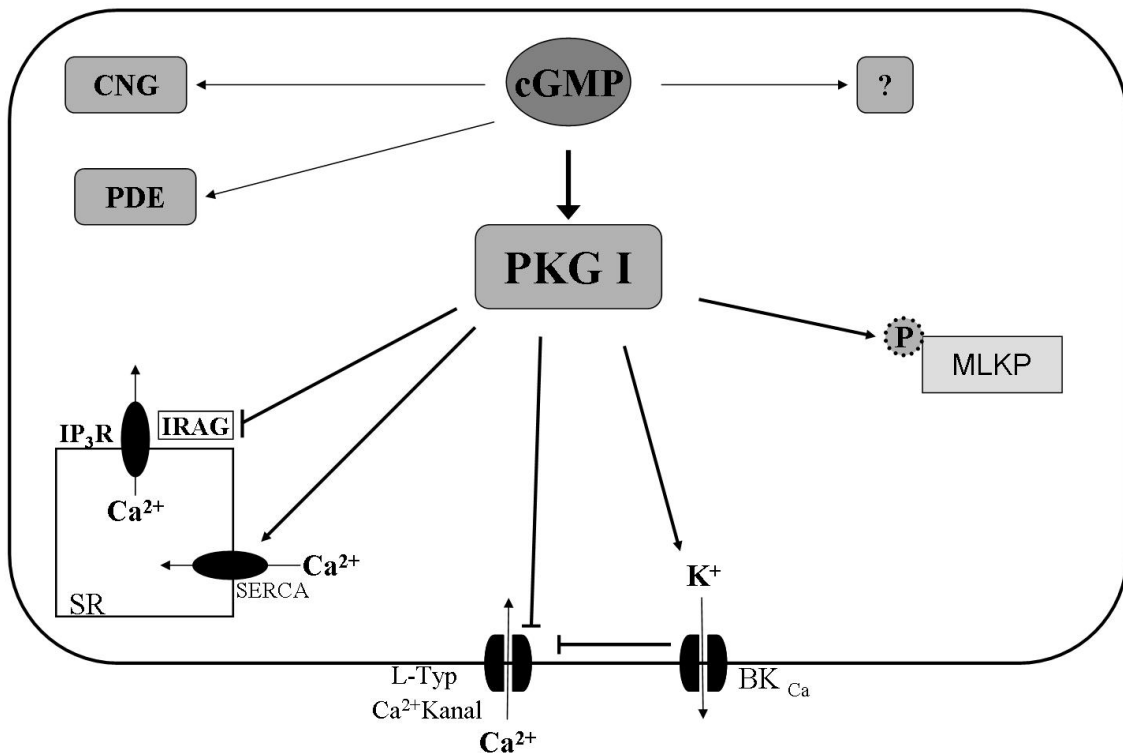


Abb. 3: Zielproteine des cGMP in der glatten Gefäßmuskulatur.

Zielproteine des cGMPs sind Phosphodiesterasen (PDE), durch zyklische Nucleotide regulierte Kationenkanäle (CNG), Proteinkinase G I (PKG I) und evtl. weitere unbekannte Proteine (?). Eine Aktivierung der PKG I führt zur Senkung des intrazellulären Calciums (Ca²⁺). Dies wird durch Inhibition des Ca²⁺-Einstroms durch L-Typ Ca²⁺-Kanäle, durch Aktivierung Calcium abhängiger Kaliumkanäle (BK_{Ca}) und direkte Inhibition des L-Typ Ca²⁺-Kanals, und vermehrte Speicherung im Sarkoplasmatischen Reticulum (SR) erreicht. Die vermehrte Speicherung im SR erfolgt durch eine Aktivierung der Sarkoplasmatischen Reticulum ATPase (SERCA) und durch Hemmung des Inositoltriphosphatrezeptor(IP₃R)-assoziierten PKG-Substrates (IRAG). Phosphorylierung der Myosin-Leichtketten-Phosphatase (MLKP) führt zur Abnahme der Calciumsensitivität des kontraktiven Systems. Eine Erhöhung von cGMP im Gefäßsystem führt zur Vasodilatation und damit zur Abnahme des Blutdruckes.

1.2.2.2 Myokardiale Effekte von zyklischem Guanosinmonophosphat

Zyklisches Guanosinmonophosphat ist ein wichtiges Protein in der Regulation der kardialen Funktionen und der Umbauprozesse des Myokards (Hofmann et al., 2006). Im Folgenden werden die Effekte von cGMP auf die Kontraktilität, die Elastizität und das Wachstum der Kardiomyozten sowie den Energiehaushalt geschildert (siehe auch Abb. 4, Seite 14).

Die Kontraktilität des Myokards wird über cAMP und cGMP reguliert.

Dabei konnte eine positiv inotrope Wirkung von niedrigen cGMP-Konzentrationen gezeigt werden. Die positive Inotropie resultiert hier aus einer Inhibition der PDE 3 und konsekutivem Anstieg von cAMP (Senzaki et al., 2001).

Hohe Konzentrationen an cGMP wirken wiederum negativ inotrop auf das Vorhofmyokard (Wegener et al., 2002). Dies geschieht durch eine Desensibilisierung der Myofilamente für Calcium (Vila-Petroff et al., 1999) und durch Inhibition der Calcium-Ströme durch den L-Type Calcium-Kanal (Mery et al., 1991; Yang et al., 2007).

Interessanterweise konnte aber im Gegenzug dazu demonstriert werden, dass PKG I-Aktivierung über CNP und GC-B am Herzen einen positiven inotropen und lusitropen Effekt hervorrufen kann (Pierkes et al., 2002; Wollert et al., 2003). Dieser Effekt erklärt sich durch eine Phosphorylierung von Phospholamban, die sekundär zu einer Erhöhung des für die Kontraktion der Myofibrillen essenziellen Calciums führt. Ebenso verantwortlich hierfür ist eine Inhibition der PDE 3, die zur Erhöhung von cAMP führt (Wollert et al., 2003).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass cGMP über PKG I sowohl positiv als auch negativ regulierend auf die Kontraktilität sowie die Elastizität der Kardiomyozyten wirken kann, je nachdem, in welchem intrazellulären Kompartiment das cGMP entstanden ist.

Ein für die Regulation der Kontraktilität des Herzmuskels essenzielles Protein ist Troponin I (Farah und Reinach, 1995; Solaro et al., 2008). Durch die Phosphorylierung von Troponin I (Tn I) durch PKG I und auch PKA nimmt die Lusitropie des Myokards zu (Blumenthal et al., 1978; Li et al., 2000). Ebenso wird Titin durch PKA und PKG I phosphoryliert (Krueger und Linke, 2009; Linke, 2008). Titin ist ein elastisches Protein, das die Z-Linie mit dem Myosinfilament im quergestreiften Muskel verbindet. Es reguliert die Elastizität des Muskels (Maruyama, 1997). Die Phosphorylierung von Titin

durch PKA führt im Herzen zu einer Abnahme der passiven Steifheit (Linke, 2008). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die PKG I über Titin den diastolischen Tonus des Herzmuskels, die Dehnungsfähigkeit des linken Ventrikels, sowie die Relaxationsgeschwindigkeit des Herzmuskels reguliert (Krueger et al., 2009).

Zudem werden indirekte und direkte Effekte von cGMP auf das Kardiomyozytenwachstum diskutiert (Kilic et al., 2005; Kishimoto et al., 2001). Am Mausmodell konnten dabei die ihm folgenden erläuterten Effekte des cGMP beobachtet werden. Indirekte Effekte erklären sich hierbei aus dem oben erläuterten Zusammenhang zwischen arteriellen Blutdruck und der Wandstärke des Herzens. Eine globale Deletion der GC-A und eine daraus resultierende Reduktion der Synthese von cGMP führt zur arteriellen Hypertonie und einer daraus entstehenden massiven Herzhypertrophie (Franco et al., 1998; Lopez et al., 1995; Oliver et al., 1997; Yurukova et al., 2007). Eine kardiomyozytenspezifische Deletion der GC-A löst eine Myokardhypertrophie mit Anstieg der zellulären Hypertrophie-Marker aus und erhöht die Menge des systemisch zirkulierenden ANPs. Aus Letzterem resultiert wahrscheinlich auch die leichte Erniedrigung des systolischen Blutdruckes dieser Tiere (Holtwick et al., 2003). Konkordant dazu führt eine Erhöhung des ANPs zur Reduktion des Blutdruckes und der Herzmasse (Barbee et al., 1994).

Die Beobachtungen an diesem Mausmodell zeigten, dass über GC-A synthetisiertes cGMP einen direkt antihypertrophen Effekt auf das Myokard hat, und zwar unabhängig von der Erniedrigung des Blutdruckes und der natriuretischen Wirkung des ANP (Holtwick et al., 2003; Zhao et al., 2003).

Globale Deletion der eNOS in Mäusen führt zu einer arteriellen Hypertonie (Huang et al., 1995; Shesely et al., 1996), allerdings ist die aus einer eNOS-Deletion resultierende Myokardhypertrophie im Vergleich zu den GC-A Knockout-Tieren sehr viel milder ausgeprägt (Bubikat et al., 2005). Ein Mausmodell mit Deletion der eNOS und kardiomyozytenspezifischer Deletion der GC-A zeigte, dass die hieraus resultierende Hypertrophie des Herzmuskels signifikant stärker ausgeprägt ist, als eine alleinige Deletion eines der Systeme (Bubikat et al., 2005).

PKG I wird als wichtiges Protein in der Regulation des Kardiomyozytenwachstums postuliert, da es in vitro an neonatalen Kardiomyozyten gelungen ist, durch Überexpression von PKG I das Kardiomyozytenwachstum zu inhibieren (Wollert et al.,

2002). Die Signalwege, auf denen eine Aktivierung von PKG I zur Inhibition des Kardiomyozytenwachstums führt, sind bislang noch unzureichend geklärt.

Vermutet wird eine Inhibition der Calcineurin-Signalkaskade. Dabei wird zum einen der Ca^{2+} -Einstrom durch den L-Typ- Ca^{2+} Kanal gehemmt, zum anderen wird die Aktivierung von NFAT über Calcineurin inhibiert, sowie vermutlich die Calcineurin vermittelte MEF 2 Aktivierung geblockt (Fiedler et al., 2002; Fiedler und Wollert, 2004).

Ebenfalls vermutet wird eine inhibitorische Wirkung von cGMP, das durch natriuretische Peptide synthetisiert wird, auf MAPK / ERK Signalwege. Daraus resultiert eine Hemmung des Zellwachstums (Ellmers et al., 2007; Pandey et al., 2000; Prins et al., 1996).

PKG I reguliert unter anderem $G_{\alpha q}$ -Protein gekoppelte Signaltransmission, in dem es durch Aktivierung des „Regulators für G-Protein Signaltransduktion 2“ (RGS2), die an $G_{\alpha q}$ -Protein gekoppelte Übertragung von Stresssignalen blockiert und damit einem kompensatorischen Wachstum der Kardiomyozyten entgegenwirkt (Takimoto et al., 2009). Als Stresssignale fungieren hier Angiotensin II (AT II) und Endothelin-1 (ET-1). Diese aktivieren über $G_{\alpha q}$ -Proteine unter anderem die Öffnung von Transienten Rezeptorpotential-Kanälen vom „Canonical-Typ“ (TRPC-Kanäle), führen zum Einstrom von Ca^{2+} und aktivieren Signalmediatoren des Kardiomyozytenwachstums, wie CaMKII und Calcineurin. Diese $G_{\alpha q}$ -Signalwege werden durch RGS2 gehemmt. PKG I phosphoryliert und aktiviert RGS2 spezifisch und verstärkt so seine hemmende Wirkung. Außerdem phosphoryliert PKG I die TRPC3 und C6 Kanäle im Herzen direkt und hemmt dadurch den Ca^{2+} -Einstrom (Koitabashi et al., 2009).

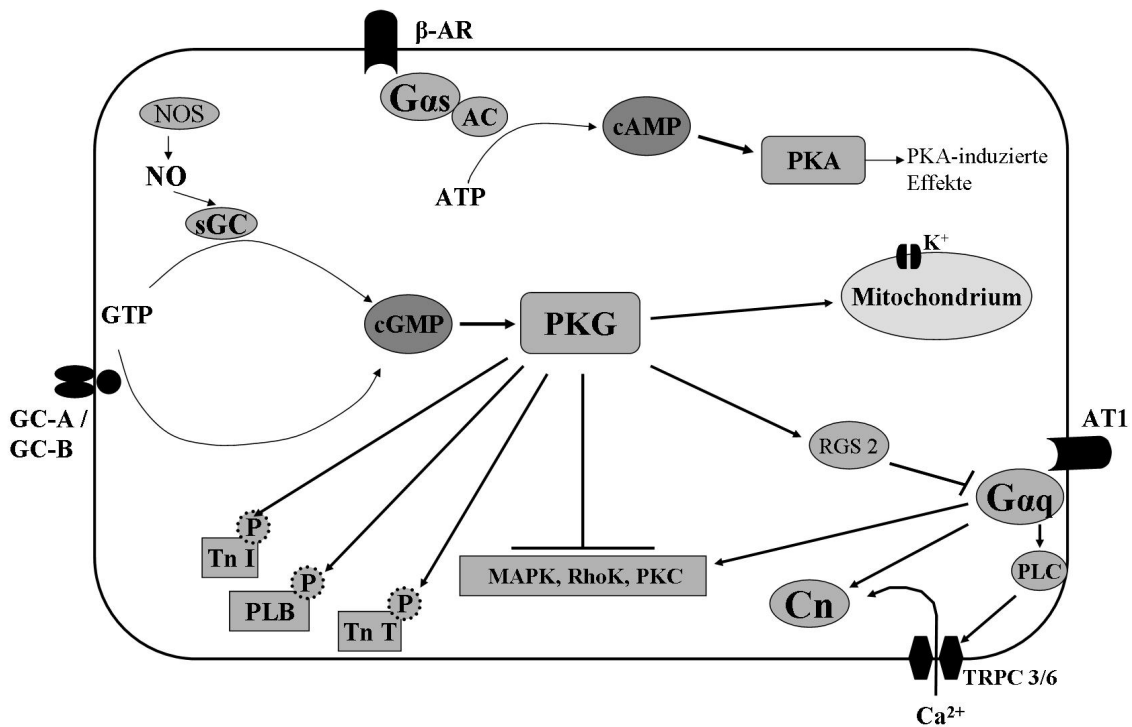


Abb. 4: Vereinfachte Darstellung der Signalträger, welche durch cGMP im Kardiomyozyten moduliert werden.

Aktivierung des β -adrenergen Rezeptors (β -AR) kann zu einer über Stickstoffmonoxidsynthase (NOS) und Stickstoffmonoxid (NO) induzierten Aktivierung der löslichen Guanylylzyklase (sGC) führen, woraus eine Synthese von zyklischen Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP) resultiert. Ebenso wird über G-Protein (G_s) die Adenylatzyklase aktiviert (AC), die aus Adenosintriphosphat (ATP) zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) synthetisiert. cAMP aktiviert Proteinkinase A, die zu einer Reihe von hier nicht diskutierten Effekten führt. cGMP wiederum wird auch über Guanylylzyklase A und B (GC-A / GC-B) synthetisiert, und aktiviert anschließend Proteinkinase G I (PKG). PKG phosphoryliert Troponin I (Tn I) und Troponin T (Tn T) und Phospholamban (PLB). Diese Phosphorylierung führt zur Regulation der Kontraktilität des Myokards. Außerdem werden Calcineurin (Cn), Mitogen-Aktivierte-Protein-Kinasen (MAPK), Rho Kinase (RhoK) und Proteinkinase C (PKC), allesamt Regulatorproteine des Kardiomyozytenwachstums, durch PKG indirekt gehemmt. Durch Aktivierung des „Regulators für G-Protein Signaltransduktion 2“ (RGS2), wird die an G_{aq} -Protein gekoppelte Übertragung von Stresssignalen z. B. über Angiotensin I-Rezeptor (AT1) blockiert. Damit wird einer Aktivierung von Wachstumssignalen wie Cn, MAPK, RhoK und PKC entgegengewirkt. Aktivierung von G_{aq} führt ebenso durch Aktivierung der Phospholipase C zur Öffnung von Transienten-Rezeptor-Potential-Kanälen vom „Canonical Typ“ 3 und 6 (TRPC 3/6). Einstrom von Calcium (Ca^{2+}) via TRPC führt zur Aktivierung von Calcineurin.

Die gesteigerte intrazelluläre cGMP-Konzentration durch Gabe von Phosphodiesterasehemmern zeigt in Ischämie-Reperusionsmodellen und Myokardinfarkt-Simulationen eine kardioprotektive Wirkung (Kukreja, 2007). Dies wird z. B. an einer geringeren Größe des Infarktareals, sowie an einer geringeren Nekrose und Apoptose nach Induktion hypoxischer Zustände sichtbar (du Toit et al., 2005; Zaccolo und Movsesian, 2007).

Ebenfalls positiv wirkt ein cGMP vermittelter Anstieg des Kreatinkinase-Gehaltes im Herzen (Hassan und Ketat, 2005), wodurch die Energieversorgung der Herzmuskelzellen optimiert wird. Auch die cGMP-medierte Öffnung mitochondrialer Kalium-Kanäle wirkt sich positiv auf den myokardialen Energiehaushalt aus. Dadurch wird das Membranpotential derart verschoben, dass mehr ATP generiert wird und damit dem Herzen zu Verfügung steht (Ockaili et al., 2002).

Zusammenfassend hat der Signalträger cGMP im Kardiomyozyten eine wichtige Bedeutung in der Modulation der Kontraktilität, des Myozytenwachstums und des Stoffwechsels.

1.3 Sildenafil

1.3.1 Pharmakokinetik und Wirkmechanismus

Sildenafilcitrat (im Folgenden verkürzt als Sildenafil bezeichnet) kam 1998 unter dem Markennamen Viagra® zur Behandlung der erektilen Dysfunktion auf den Markt (Shinlapawittayatorn et al., 2005). 2006 wurde es unter dem Markennamen Revatio® als Mittel gegen idiopathische pulmonal-arterielle Hypertonie zugelassen.

Bei oraler Applikation ist die maximale Plasmakonzentration des Wirkstoffes im menschlichen Körper bereits nach 30 bis 120 Minuten erreicht, die Plasmahalbwertszeit beträgt drei bis fünf Stunden im Menschen (Cheitlin et al., 1999). Die absolute Bioverfügbarkeit beträgt bei einer hohen Plasmaeiweißbindung (96 %) etwa 40 % (Muirhead et al., 2002). Bei Metabolisierung durch die Cytochrom-p450 Isoenzyme 3A4 und 2C9 der Leber (Hyland et al., 2001) entsteht das ebenfalls aktive N-desmethylierte Sildenafil (Cheitlin et al., 1999). Das Verteilungsvolumen von

Sildenafil in Mensch und Nager ist annähernd äquivalent. Allerdings wurde eine im Vergleich zu Mensch und Hund höhere Clearance im Nager beobachtet. Daraus resultiert eine kürzere Plasmahalbwertszeit von Sildenafil im Nager (Walker et al., 1999). Diese Beobachtung deckt sich mit den in vitro gezeigten, jeweils unterschiedlichen Metabolisierungsraten der Mikrosomen in der Leber von Mensch, Hund und Nager (Walker et al., 1999).

1.3.2 Phosphodiesterase 5A

Sildenafil hemmt die katalytische Aktivität der Phosphodiesterase 5A (PDE 5A), wodurch ein Abbau des zyklischen 3`5`-Guanosinmonophosphat (cGMP) zu 5`-Guanosinmonophosphat (5`GMP) verhindert wird und eine Anreicherung von cGMP im Zytosol erfolgt.

PDE 5A ist ein im Zytosol lokalisiertes Isoenzym der Phosphodiesterase –Familie, das zunächst aus Ratten-Thrombozyten isoliert und charakterisiert wurde (Coquil et al., 1980). Des Weiteren konnte dieses Enzym im Corpus Caverosum des Penis, in Lunge, Kleinhirn, dem Herzen und glatter Muskulatur von Arterien, Trachea und diversen Organen nachgewiesen werden (Cheitlin et al., 1999; Omori und Kotera, 2007; Takimoto et al., 2005a; Yanaka et al., 1998). Abbildung 5 zeigt die Hydrolyse eines zyklischen Nukleotids durch Phosphodiesterasen.

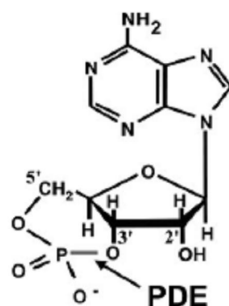


Abb. 5: Hydrolyse eines zyklischen Nukleotids durch Phosphodiesterasen (PDE) (Bender und Beavo, 2006).

Dabei wird die 3` zyklische Phosphatbindung gespalten, hier dargestellt für cAMP. Produkte dieser Reaktion sind 5`Adenosinmonophosphat oder 5`Guanosinmonophosphat.

PDE 5A ist eine cGMP-bindende, spezifisch cGMP-hydrolysierende PDE. Strukturelle Merkmale der PDE 5 sind die katalytische Domäne, die N-terminale GAF-A- und GAF-B-Domäne, sowie eine Phosphorylierungsstelle an einem Serinrest nahe der GAF-A-Domäne. GAF ist ein Akronym, welches aus den ersten drei beschriebenen Domänen gebildet wurde, nämlich cGMP-bindende PDEs im Säugetier, Anabaena Adenylylzyklasen und FhlA Transkriptionsfaktoren in Pflanzen (Bender und Beavo, 2006).

Erfolgt die Bindung von cGMP an die GAF-A-Domäne des Enzyms, wird eine Phosphorylierung des Enzyms hauptsächlich durch die cGMP-abhängige Proteinkinase G I (PKG) (Corbin et al., 2005) oder durch cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) und eine dadurch erfolgende Aktivierung der katalytischen Domäne ermöglicht. Diese Phosphorylierung erhöht wiederum die Affinität des Enzyms zur cGMP-Bindung (Francis et al., 2002). Da eine Phosphorylierung der PDE 5 nur erfolgen kann, sofern cGMP gebunden ist und diese Phosphorylierung wiederum die Affinität für die cGMP-Bindung steigert, wird dies als positiver Rückkopplungsmechanismus betrachtet. Nur in Zellen, in denen eine suffiziente cGMP Synthese stattfindet, kann die PDE 5 erfolgreich eine Hydrolyse von cGMP bewirken (Corbin et al., 2005).

Sildenafil kann aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu cGMP (siehe Abb. 6) an die katalytische Domäne der PDE 5A binden, wodurch die katalytische Aktivität derselben gehemmt wird und damit eine Anreicherung von cGMP erfolgt (Kukreja et al., 2004).

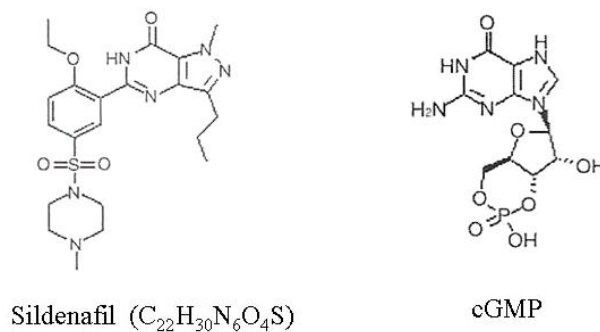


Abb. 6: Vergleich der Struktur von Sildenafil und cGMP (Kukreja et al., 2004)
Gezeigt sind die Strukturformeln von Sildenafil und cGMP. Aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu cGMP kann Sildenafil die katalytische Domäne der PDE 5 A hemmen.

1.3.3 Pharmakodynamik und Nebenwirkungen

Eine Anreicherung von cGMP im Gewebe führt zur Vasodilatation. Einige unerwünschte Wirkungen des Präparates lassen sich teilweise anhand dieser Gefäßerweiterung erklären, beispielsweise das Auftreten von Kopfschmerzen, Rhinitis, Schwindelgefühlen und Hypotonie (Oliver et al., 2006).

Wirkungen auf Visus und Helligkeitsempfinden, sowie Farbempfindungsstörungen werden verursacht durch eine gleichzeitige Hemmung der PDE 6, welche in den Photorezeptoren der Retina lokalisiert ist. Die Affinität von Sildenafil zur PDE 5 ist nur zehnfach höher als zur PDE 6 (Cheitlin et al., 1999). Im Vergleich dazu ist die Affinität zur Hemmung der PDE 5 4000 mal höher als zur Hemmung der PDE 3 (Shinlapawittayatorn et al., 2005).

Des Weiteren werden gastrointestinale Beschwerden, beispielsweise Dyspepsien, und Myalgien berichtet.

Neue experimentelle Studien lassen vermuten, dass Sildenafil nicht nur als vasodilatatives Agens zur Behandlung der Erektile Dysfunktion und Pulmonalen Arteriellen Hypertonie geeignet sein könnte. Darüber hinaus könnte es auch protektive Effekte am Herzen selbst haben und hier einer Herzhypertrophie und einer funktionellen Insuffizienz entgegenwirken (Ferreira-Melo et al., 2006; Takimoto et al., 2005b). Fibrosierung und Nekrose des Herzens konnten durch Gabe von Sildenafil attenuiert werden. Über eine Freisetzung von Mediatoren wie Adenosin und Bradykinin in einem Modell der Myokardischämie bei Mäusen (Ferreira-Melo et al., 2006) wirkt Sildenafil positiv. Diese Mediatoren können im Herzen Stickstoffmonoxid (NO) freisetzen. NO wiederum kann zumindest an isolierten Kardiomyozyten das Zellwachstum hemmen (Shah, 2005).

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Obwohl zunächst von der Firma Pfizer als Mittel gegen pektanginöse Beschwerden und damit als kardiovaskulär wirksames Therapeutikum entwickelt, konnte Sildenafil diese Wirkung in einer klinischen Studie nicht befriedigend entfalten. Später zeigte sich das therapeutische Potential Sildenafil in der Behandlung der Erektile Dysfunktion sowie der pulmonalen arteriellen Hypertonie. Tierexperimentelle Studien ließen darüber hinaus vermuten, dass Sildenafil protektive Effekte bei Herzhypertrophie haben könnte. Aufgrund der hohen Prävalenz der Myokardhypertrophie mit konsekutiv erhöhter Morbidität und Mortalität sind die zellulären Transduktionsmechanismen und die Regulatoren, die zu einer Herzhypertrophie führen oder diese mindern können, Gegenstand intensiver Forschung. Da in vorangegangenen Studien anderer Autoren postuliert wurde, dass Sildenafil in einem tierexperimentellen, murinen Modell der Myokardhypertrophie, ausgelöst durch operative Einengung der Aorta, dem exzessiven Wachstum der Herzmuskelzellen entgegenwirken kann (Takimoto et al., 2005b), sollten die Effekte von Sildenafil in dieser Dissertation in zwei separaten Versuchsansätzen an Mäusen untersucht werden.

Im ersten Versuchsansatz sollte untersucht werden, wie sich eine Erhöhung des cGMP-Gehaltes mittels Gabe von Sildenafil auf eine artifiziell druck-induzierte Linksherzhypertrophie auswirkt. Diese Herzhypertrophie wird mittels operativer Stenosierung der Aorta durch Transverse Aorten-Konstriktion (TAC) erreicht. Im Vergleich zur Studie von Takimoto et al. (Takimoto et al., 2005b) sollte hierbei eine moderate Stenose der Aorta erfolgen, damit eine zusätzliche Druckbelastung von 40 - 50 mmHg auf den linken Ventrikel einwirkt. Diese vergleichsweise moderate Stenose kommt der Belastung des menschlichen Herzens durch Steigerung der Nachlast, z. B. bei essenzieller arterieller Hypertonie, näher. Dieses Modell kann die therapeutische Anwendung Sildenafil in einem System der arteriellen Hypertonie mit konsekutiver Myokardhypertrophie widerspiegeln.

Zudem können in diesem Ansatz die direkt positiven Effekte von cGMP auf das Kardiomyozytenwachstum in vivo aufgezeigt werden. Da die Druckbelastung des linken Ventrikels bei TAC irreversibel ist, sind mögliche kardiale Effekte unabhängig

von einer positiven Beeinflussung der Hämodynamik in Form einer Nachlastsenkung. Diese direkten Effekte sind insbesondere wichtig, weil sie in der Therapie der Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz einen Vorteil gegenüber anderen pharmakologischen Therapieoptionen bieten würden.

Im zweiten Versuchsansatz der Dissertation sollte erarbeitet werden, welche cGMP-produzierenden Synthesewege im kardiovaskulären System durch Sildenafil beeinflusst werden. Hier gibt es mindestens drei Systeme, welche über eine intrazelluläre Bildung von cGMP wirken: ANP / GC-A, NO / sGC und CNP / GC-B. Für diese Systeme wurden bereits antihypertrophe Effekte über eine cGMP-Bildung beschrieben.

Wie zuvor erörtert (siehe 1.2.1), scheint die cGMP-Bildung im Kardiomyozyten kompartimentalisiert zu sein. Ursächlich hierfür ist einerseits die unterschiedliche Lokalisation der Guanylylzyklen und andererseits die der abbauenden PDEs. Dies konnte zumindest in Studien an isolierten adulten Myozyten von Ratten gezeigt werden (Fischmeister et al., 2006). PDE 5 scheint eher zytoplasmatisch lokalisiert zu sein und den Anteil des cGMP zu regulieren, der durch sGC synthetisiert wurde. PDE 2 scheint sich eher in Nähe der Zellmembran zu befinden und reguliert daher das durch GC-A gebildete cGMP (Castro et al., 2006; Fischmeister et al., 2006).

Bislang ist allerdings unklar, ob Sildenafil durch seine PDE 5-Hemmung alle drei cGMP-bildenden Systeme (GC-A, GC-B, sGC) verstärkt, oder aber nur eines davon, basierend auf den verschiedenen, örtlich disseminierten Synthesewegen und den unterschiedlich lokalisierten Kompartimenten der abbauenden PDEs.

Unter pathologischen Bedingungen wie Herzhypertrophie, arterieller Hypertonie und Herzinsuffizienz ändert sich zudem die Expression vieler Signalmodulatoren. So steigt beispielsweise die Synthese und Ausschüttung von ANP und BNP unter oben genannten Bedingungen an (Burnett et al., 1986; Mukoyama et al., 1990). Daher war wichtig herauszuarbeiten, welche Systeme in solch einer Situation cGMP generieren, das durch Gabe von Sildenafil akkumulieren kann. Es sollte untersucht werden, ob die vasodilatierenden, blutdrucksenkenden und möglichen kardialen Effekte von Sildenafil auf einer Verstärkung des ANP / GC-A-Signalweges beruhen.

Deshalb wurden Mäuse mit globaler Deletion des GC-A Rezeptors für ANP untersucht (GC-A $-/-$). Dieses Tiermodell zeichnet sich durch eine manifeste Herzhypertrophie, chronische arterielle sowie Pulmonale Arterielle Hypertonie und Fibrose (Holtwick et

al., 2003; Kuhn, 2005) aus. Es eignet sich daher in hohem Maße für die Demonstration positiver Effekte einer cGMP-Erhöhung auf eben diese phänotypischen Charakteristika. Fraglich war hierbei, ob sich der Phänotyp dieses Mausmodells durch Gabe von Sildenafil verändert. Der Einsatz von GC-A-defizienten Tieren beschränkt die Möglichkeiten der cGMP-Synthese im kardiovaskulären System. Es bleibt ein wichtiger Syntheseweg für cGMP verschlossen, d. h. es kann hauptsächlich über NO / sGC cGMP synthetisiert werden, oder aber über alternative, noch nicht bekannte Wege. Dieser Versuchsansatz sollte zeigen, ob Sildenafil die arterielle Hypertonie und Herzhypertrophie von GC-A-defizienten Mäusen mindern kann. Ein positives Ergebnis würde die These stützen, dass Sildenafil die Effekte des NO / sGC / cGMP-Systems verstärkt. Ein negatives Resultat dagegen würde belegen, dass die therapeutischen antihypertensiven und antihypertrophen Effekte von Sildenafil durch eine Verstärkung des ANP / GC-A / cGMP Systems vermittelt werden.

2 Methodik

2.1 Tiere und Studiendesign

2.1.1 Studie zu den Effekten von Sildenafil in einem murinen Modell der Herzhypertrophie nach Transverser Aortenkonstriktion

Zunächst wurden 21 männliche C57Bl/6 Tiere im Alter von neun Wochen in drei Gruppen unterteilt (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Übersicht zu den Gruppeneinteilungen

Gruppe	Stamm	Geschlecht	Alter in Wochen	Operatives Vorgehen	Behandlung	Anzahl der Tiere
1	C57Bl/6	männlich	9	Sham	Placebo	7
2	C57Bl/6	männlich	9	TAC	Placebo	7
3	C57Bl/6	männlich	9	TAC	Sildenafil	7

Gruppe 1 war ein Kontrollkollektiv, an dem eine sogenannte Sham-Operation vorgenommen wurde, d. h. es erfolgte ein Hautschnitt mit anschließendem Wundverschluss ohne weitere chirurgische Maßnahmen.

In den Gruppen 2 und 3 wurden vor Beginn der Studie echokardiographische Untersuchungen durchgeführt. Anschließend wurde eine operative Stenosierung der Aorta (TAC) vorgenommen. In Gruppe 3 erfolgte eine Behandlung mit Sildenafil.

Nach zwei und vier Wochen wurden weitere echokardiographische Untersuchungen vorgenommen. Abschließend erfolgten invasive Blutdruckmessungen in der A.carotis dextra und A.femoralis sinistra an narkotisierten Mäusen. Diese Tiere wurden dann unter der Narkose geopfert und verschiedene Organe entnommen. Das Herzgewebe wurde histologisch sowie proteinchemisch untersucht. Des Weiteren wurde der cGMP-Gehalt des linken Ventrikel und der Lunge bestimmt (siehe Abb. 7).

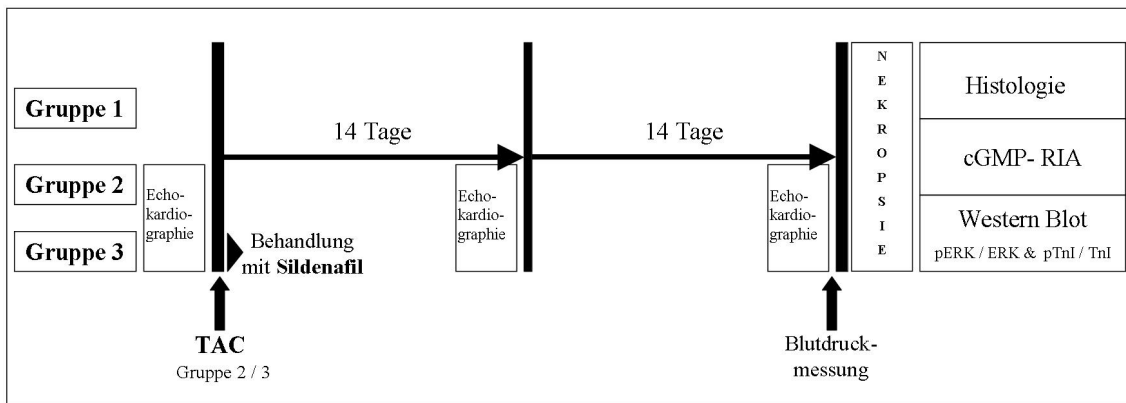


Abb. 7: Übersicht über das Studiendesign.

In Gruppe 1, 2 und 3 befanden sich jeweils sieben C57Bl/6 Tiere. TAC bezeichnet die operative Stenosierung der Aorta in den Gruppen 2 und 3. Gruppe 1 erhielt eine Sham-Operation. Vor Nekropsie und Organentnahme wurde der Blutdruck invasiv in der A. carotis dextra und A. femoralis sinistra gemessen. Im Radioimmunoassay (RIA) wurde der cGMP-Gehalt von Herz und Lunge gemessen. Western Blots von Proteinextrakten aus dem Herzen erfolgten zum Nachweis von phosphorylierter Extrazellulär Regulierter Kinase (pERK) im Verhältnis zur totalen Extrazellulär Regulierten Kinase (ERK) und phosphoryliertem Troponin I (pTn I) im Verhältnis zum gesamten Troponin I (Tn I).

2.1.2 Studie zu den kardiovaskulären Effekten von Sildenafil an Mäusen mit globaler Deletion des Guanylylzyklase-A Rezeptors

Mäuse mit globaler Deletion des GC-A Gens wurden in der Arbeitsgruppe von Professor D.L. Garbers (University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, Texas) generiert (Lopez et al., 1995) und am Institut für Physiologie in Würzburg gezüchtet. Sie wurden im Alter von 17 Wochen in zwei Kollektive unterteilt, ein behandeltes und ein unbehandeltes Kollektiv. Ebenso wurden Mäuse, die deren Wildtyp entsprechen (im Folgenden als GC-A $+/+$ bezeichnet) in ein behandeltes und ein unbehandeltes Kollektiv unterteilt. Damit ergaben sich vier Untergruppen, wobei die Gruppen A und B dem Wildtyp entsprachen, und die Mäuse der Gruppen C und D die Deletion der GC-A aufwiesen (im Folgenden als GC-A $-/-$ bezeichnet). Die Sildenafil-Applikation erfolgte in den Gruppen B und D (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Übersicht zu den Gruppeneinteilungen

Gruppe	Stamm	Geschlecht	Alter in Wochen	Behandlung	Anzahl der Tiere
A	GC-A +/+	männlich	17	Placebo	5
B	GC-A +/+	männlich	17	Sildenafil	5
C	GC-A -/-	männlich	17	Placebo	8
D	GC-A -/-	männlich	17	Sildenafil	8

In dieser Studie wurden vor Beginn und Ende der neunwöchigen Behandlungsperiode jeweils echokardiographische Aufnahmen angefertigt und plethysmographische Blutdruckmessungen an der Schwanzarterie (siehe unten) durchgeführt. Das Vorgehen nach Behandlungsende entsprach der ersten Studie und wird im Folgenden erläutert.

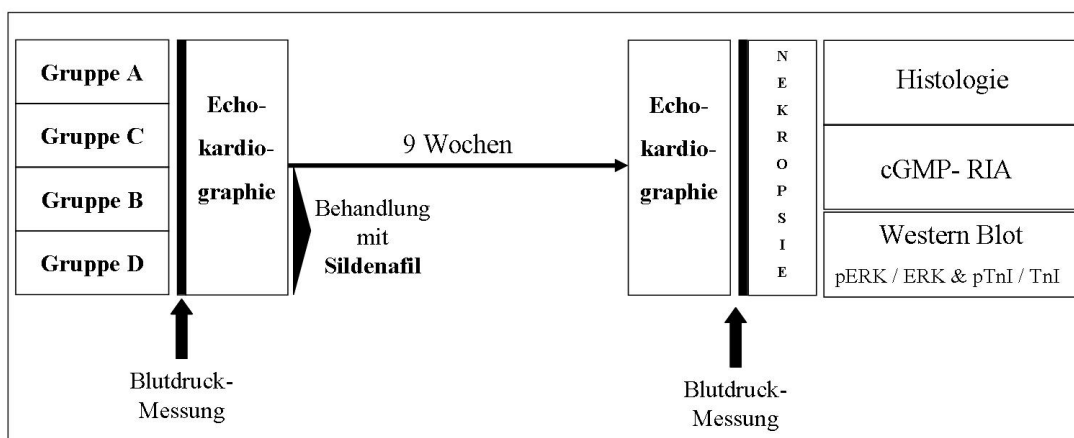


Abb. 8: Übersicht über das Studiendesign.

Gruppe A, n = 5: GC-A +/+, Behandlung mit Placebo; Gruppe B, n = 5: GC-A +/+, mit Sildenafil behandelt; Gruppe C, n = 8: GC-A -/-, Behandlung mit Placebo, Gruppe D, n = 8 GC-A -/-, mit Sildenafil behandelt. Die Blutdruckmessungen erfolgten nicht-invasiv. Im Radioimmunoassay (RIA) wurde der cGMP-Gehalt von Herz und Lunge gemessen. Western Blots von Proteinextrakten aus dem Herzen erfolgten zum Nachweis von phosphorylierter Extrazellulär Regulierter Kinase (pERK) im Verhältnis zur totalen Extrazellulär Regulierten Kinase (ERK) und phosphoryliertem Troponin I (pTn I) im Verhältnis zum gesamten Troponin I (Tn I).

2.1.3 Behandlung von Mäusen zur Bestimmung der Plasmaspiegel von Sildenafil

Zur Bestimmung der Sildenafil-Plasmaspiegel wurden zusätzlich Wildtyp Mäuse für 14 Tage mit Sildenafil behandelt. Die Applikation von Sildenafil erfolgte per os mit dem Futter, nach dem unten beschriebenen Vorgehen. Anschließend wurden Plasmaproben von diesen Tieren gewonnen.

2.2 Tierhaltung

Die Tiere waren während der gesamten Studiendauer im Tierstall des Physiologischen Instituts in Würzburg untergebracht. Die Tierhaltung erfolgte bei einer Temperatur von 20°C und einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden, wobei die Lichtphase von 7.00 bis 19.00 Uhr andauerte. Die Tiere hatten ständig freien Zugang zu Wasser und Futter.

Die Pharmakotherapie erfolgte mit der Futtergabe. Hierfür wurden Sildenafil-Tabletten mit einem Wirkstoffgehalt von 100 mg bei Sanofi Aventis in Frankfurt pulverisiert, handelsüblichem Futter beigemischt und zu Pellets gepresst. Die den Mäusen angebotenen Futterpellets enthielten pro Kilogramm ein Gramm Sildenafilcitrat. Die erfolgreiche Aufnahme von Sildenafil wurde durch regelmäßiges Wiegen des Futters und ein damit verbundenes Ermitteln des täglichen Verzehrs kontrolliert. Das Kontrollfutter für die unbehandelten Gruppen entstammte der gleichen Tierfutter-Charge.

Das Versuchsvorhaben wurde am 21.12.2005 unter der Nummer 54-2531.01-60/05 durch die Regierung von Unterfranken genehmigt.

2.3 Transverse Aortenkonstriktion

Die operative transverse Aortenkonstriktion wurde von Herrn Dr. med. Martin van Eickels (Physiologisches Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn) an den Gruppen 2 und 3 in Würzburg vorgenommen.

Hierfür wurden neun Wochen alte, 22 bis 28 g schwere C57Bl/6-Mäuse mittels einer intraperitonealen Injektion von Ketamin (100 mg/kg KGW) und Xylazin (5 mg/kg KGW) anästhesiert. Ketamin wirkt als Antagonist am N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor hypnotisch und analgetisch, ohne eine nennenswerte Atemdepression hervorzurufen (Craven, 2007). Xylazin, ein α_2 -Rezeptor-Agonist, besitzt neben der sedativen und analgetischen Komponente zusätzlich noch muskelrelaxierende Wirkungen (Welberg et al., 2006).

Nach Fixieren der Maus in Rückenlage auf einer Wärmeplatte wurde die obere Thoraxhälfte rasiert. Die Wärmeplatte diente dazu, die Körpertemperatur unter Anästhesie und dadurch hervorgerufener Vasodilatation konstant bei 37°C zu halten.

Eine Endotrachealkanüle wurde unter laryngoskopischer Kontrolle eingeführt und an ein volumenkontrolliertes Beatmungsgerät (Atemzugvolumen 0,250 – 0,300 ml, Frequenz 120/min, Harvard Apparatus) angeschlossen.

Das weitere Vorgehen erfolgte unter einem Operationsmikroskop (Leitz, Wetzlar). Nach einem Hautschnitt über dem zweiten Interkostalraum links wurde der Aortenbogen und die aortalen Gefäßabgänge freigelegt. Die Konstriktion der Aorta erfolgte zwischen dem Abgang des Truncus brachiocephalicus und dem Abgang der A. carotis sinistra. Hierfür wurde eine 26 G Nadel (Durchmesser 0,45 mm) auf der Aorta platziert. Es erfolgte eine Ligatur um die Nadel sowie das darunter liegende Gefäß mittels 6.0 Prolene Seidenfaden. Danach wurde die Nadel entfernt. Der Durchmesser der stenosierten Aorta bei allen operierten Tieren entspricht somit dem Durchmesser der Nadel (Rockman et al., 1991).

Nach erfolgter Aortenkonstriktion wurde die Thorakotomie in Lagen verschlossen. Durch Beatmung mit positivem endexpiratorischem Druck wurde die Beatmungssituation des Tieres nach erfolgter Thorakotomie und damit entstandener Luft im Pleuraspalt verbessert.

Zur Antagonisierung der Narkose wurde Atipamezol (5mg/kg KGW), ein α_2 -Rezeptor-Antagonist verwendet (Jang et al., 2009; Pertovaara et al., 2005). Nach Einsetzen der Spontanatmung wurde die Trachealkanüle entfernt und die Mäuse wurden bis zum vollständigen Abklingen der Narkose überwacht.

Abbildung 9 zeigt die Lokalisation der Stenose im Operationssitus.

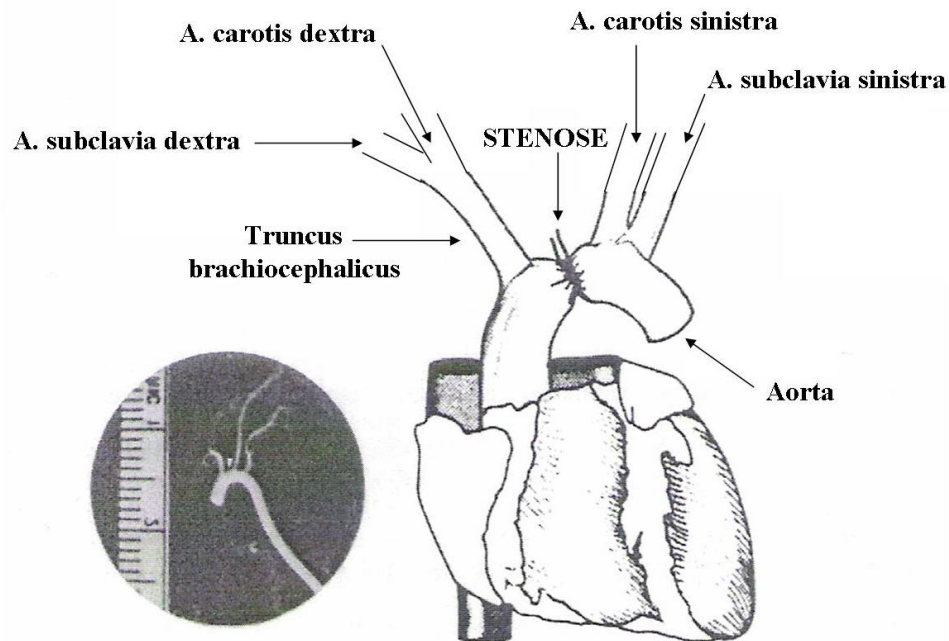


Abb. 9: Schematische Darstellung der Aortenstenose im Operationssitus.
Die Abbildung ist modifiziert nach einer Abbildung von Rockman (Rockman et al., 1991).

2.4 Echokardiographie

Die Echokardiographie wird in der kardiologischen Diagnostik als wichtiges bildgebendes Verfahren zur Beurteilung von Veränderungen der Herzwände, der Herzklappen, der Kammergröße und der Auswurfleistung genutzt. Daher wurden von den Studiengruppen (mit Ausnahme der Gruppe 1) zu verschiedenen Zeitpunkten echokardiographische Aufnahmen erzeugt (siehe Abb. 7 und 8).

Die echokardiographischen Untersuchungen wurden in der Arbeitsgruppe von Priv.-Doz. Dr. med. Stefan Frantz durch Frau Barbara Bayer an der Medizinischen

Klinik I des Universitätsklinikums Würzburg durchgeführt. Hierfür wurde den Tieren zunächst die Thoraxwand mit einem handelsüblichen Enthaarungsmittel (Pilca Creme) enthaart. Anschließend erfolgte eine Inhalationsnarkose mit 2 % Isofluran.

Echokardiogramm-Ableitelektroden nach Goldberger wurden an den Vorderläufen und dem linken Hinterlauf subkutan platziert.

Die echokardiographischen Aufnahmen wurden mit einem 14 Mhz-Schallkopf mit dem Aplio-Gerät (Siemens) in Rückenlage angefertigt. Im Zweikammerblick wurden Aufnahmen jeweils in zwei Ebenen, auf Papillarmuskelebene und apikal angefertigt. Diese Aufnahmen erfolgten in zwei Modi, dem Motion-Mode und dem 2D-Mode. Der 2D-Mode liefert ein zweidimensionales Schnittbild der Kammern, der Motion-Mode (M-Mode) erlaubt eine Darstellung von Bewegungsabläufen der Kammerwände über die Zeit. Die Auswertung der Aufnahmen erfolgte mit dem Tos-e-bas Digital Ultrasound Lab-Programm als Teil dieser Dissertation. Nach erfolgter Kalibration wurde im 2D-Mode die Kammeröffnungsfläche des linken Ventrikels (LV) systolisch und diastolisch bestimmt. Diese Kammeröffnungsflächen entsprechen den in Abbildung 10 eingezeichneten Kreisflächen. Hieraus konnte das Fractional Shortening (FS), die fraktionelle Verkürzung der Ventrikelwand, nach folgender Formel berechnet werden: $(EDA - ESA) / EDA$, wobei EDA die enddiastolische Öffnungsfläche und ESA die endsystolische Öffnungsfläche bezeichnet.

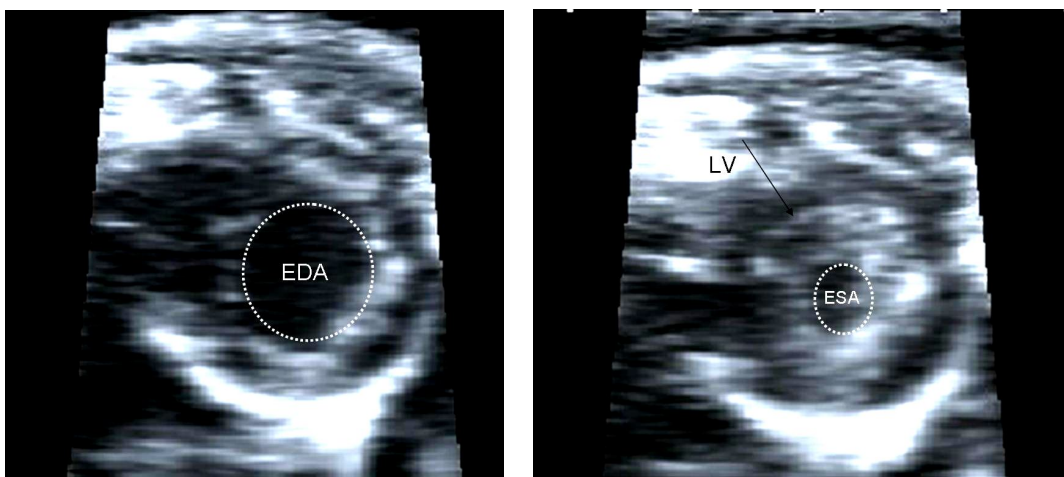


Abb. 10: Enddiastolische (EDA) und endsystolische Öffnungsfläche (ESA) in mm^2 im Transversalschnitt des murinen linken Ventrikels, 2D-Modus. Im Transversalschnitt des linken Ventrikels (LV) wurde die maximale enddiastolische (EDA) sowie endsystolische (ESA) Öffnungsfläche ausgemessen. Anteile des

Papillarmuskels wurden innerhalb der eingezeichneten Kreise vor allem in der Systole sichtbar.

Im M-Mode wurde die Dicke des interventrikulären Septums (IVSS/IVSD), Kammerdurchmesser (ESD/EDD) und Hinterwandstärke (PWS/PWD) des linken Ventrikels in der Systole (S) und in der Diastole (D) vermessen (siehe Abb. 11). Die Herzfrequenz konnte anhand der R-Zacken des Elektrokardiogramms oder im M-Mode anhand der Periodizität der Systole manuell ermittelt werden. Um die funktionellen echokardiographischen Parameter zwischen den Genotypen bzw. den Behandlungsgruppen vergleichen zu können, sollten die Herzfrequenzen (HF) der Tiere keine allzu großen Schwankungen unter den Individuen aufweisen und zwischen 500 und 600 Herzschlägen pro Minute liegen. Alle Parameter wurden jeweils dreifach gemessen, um Messungenauigkeiten zu vermeiden.

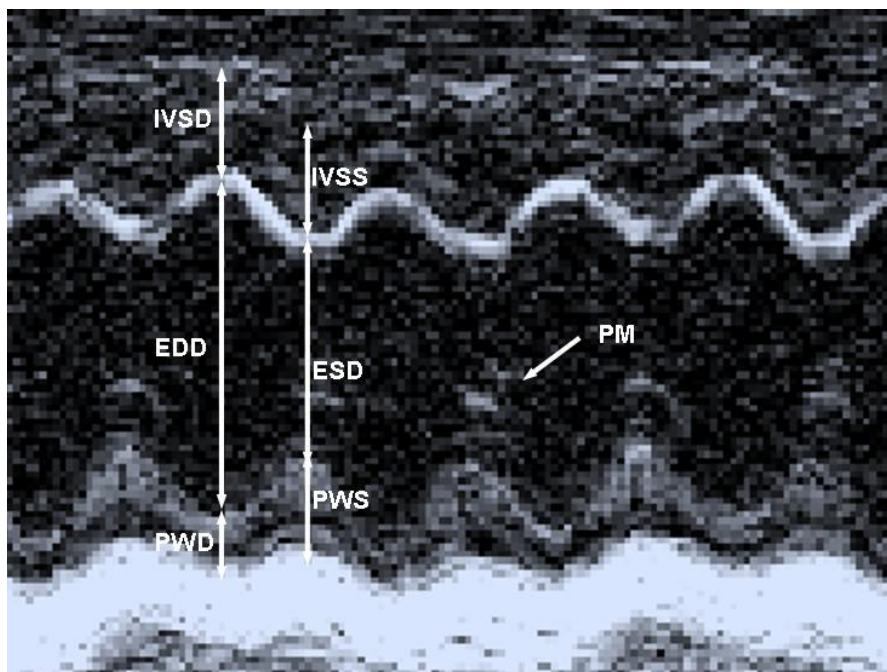


Abb. 11: M-Modus-Aufnahme des linken Ventrikels eines GC-A+/+Tieres. Während der Systole ist der Papillarmuskel (PM) gut sichtbar. IVSD = interventrikuläre Septumdicke in der Diastole; IVSS = interventrikuläre Septumdicke in der Systole; EDD = enddiastolischer Durchmesser des linken Ventrikels; ESD = endsystolischer Durchmesser des linken Ventrikels; PWD = Hinterwandstärke in der Diastole; PWS = Hinterwandstärke in der Systole.

Die folgenden Parameter wurden anschließend nach der Teichholz-Formel (Urbaszek W., 1992) berechnet: enddiastolisches linksventrikuläres Volumen (EDV), endsystolisches linksventrikuläres Volumen (ESV), Schlagvolumen (SV), Herzzeitvolumen (HZV), Ejektionsfraktion (EF) und linksventrikuläre Masse.

$$\text{EDV} = [7/(2,4 + \text{EDD})] \times \text{EDD}^3 \quad [\text{mm}^3]$$

$$\text{ESV} = [7/(2,4 + \text{ESD})] \times \text{ESD}^3 \quad [\text{mm}^3]$$

$$\text{SV} = (\text{EDV} - \text{ESV}) / 1000 \quad [\text{ml}]$$

$$\text{HZV} = \text{SV} \times \text{HF} \quad [\text{ml/min}]$$

$$\text{EF} = [(\text{EDV} - \text{ESV}) / \text{EDV}] \times 100 \quad [\%]$$

$$\text{Masse} = (\text{IVSD} + \text{EDD} + \text{PWD})^3 \times 1,05 \quad [\text{mm}^3]$$

2.5 Plethysmographische Messung des arteriellen Blutdrucks an wachen Mäusen

Um die Effekte einer Behandlung mit Sildenafil auf den arteriellen Blutdruck von GC-A defizienten (GC-A -/-) und Wildtyp-Mäusen (GC-A +/+) zu untersuchen, erfolgte eine plethysmographische Messung des Blutdruckes an der Schwanzarterie. Die Messungen wurden an wachen Mäusen der Kollektive A bis D an zwei aufeinander folgenden Tagen jeweils zwischen zehn und zwölf Uhr durchgeführt. Die Blutdruckmessungen fanden vor und nach zweimonatiger Behandlung mit Sildenafil statt. Zuvor erfolgte jeweils eine einwöchige Gewöhnungsphase der Mäuse an den Versuchsablauf, bzw. die Blutdruckmessung. Die Messungen erfolgten mit dem „Softron Indirect Blood Pressure Meter BP-98 A“ (Firma Softron, Tokio, Japan). Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 12 skizziert.

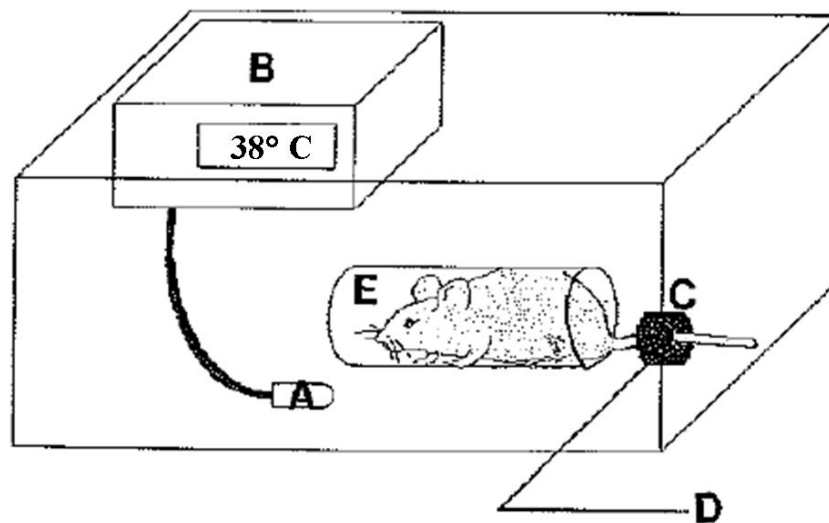


Abb. 12: Versuchsaufbau zur indirekten Blutdruckmessung (Kuwahara et al., 1991).

A: Temperatursensor. B: Heizelement. C: Schwanzmanschette. D: Verbindung zu Verstärker und Computer. E: Stofftasche. Im Versuchsaufbau dieser Dissertation war der Temperatursensor in eine Kunststoffröhre integriert, in der sich die Maus in einer Stofftasche befindet. Die Kunststoffröhre ist hier nicht abgebildet, da sie die Maus komplett verdecken würde.

Die wache Maus wurde in einer Stofftasche in eine auf 38°C vorgewärmte Kunststoffröhre gesetzt. Die Wärme fördert eine bessere Durchblutung in den distalen Extremitäten. Nach einer Gewöhnungsphase von 8 bis 10 min wurde der Maus eine Blutdruckmanschette um den Schwanz gelegt und innerhalb von 5 bis 10 min wurden jeweils 10 bis 15 Blutdruckmessungen vorgenommen. Die Manschette pumpte sich auf manuellen Befehl hin auf 180 mmHg auf und unterband somit den Blutfluss. Der Druck in der Manschette nahm kontinuierlich ab, so dass analog zur Methode von Riva-Rocci der systolische und diastolische Blutdruck mittels einer in der Manschette befindlichen lichtemittierenden Diode und einer Photodiode gemessen werden konnte (Kuwahara et al., 1991).

2.6 Invasive Blutdruckmessungen an narkotisierten Tieren

In den Kollektiven 1, 2 und 3 (TAC,- oder Sham-Operation) wurden invasive Blutdruckmessungen an der A. carotis dextra und der A. femoralis sinistra vorgenommen. Diese Versuche wurden von Frau Katharina Völker (Physiologie I, Universität Würzburg) durchgeführt. Hierbei wurde in den Kollektiven 2 und 3 der Stenosegrad der Aorta durch die entstandene Druckdifferenz zwischen den prä – (A. carotis dextra) und poststenotisch (A. femoralis sinistra) gelegenen Arterien gemessen um mit den normalen Druckdifferenzen in einem System ohne Stenose (Gruppe 1) verglichen zu werden. Damit sollte die durch die artifizielle Stenose erzeugte proximale Druckerhöhung, d. h. die Nachlast des linken Ventrikels, ermittelt werden.

An den Tieren erfolgte zunächst eine Inhalationsnarkose mit zweiprozentigem Isofluran in einer Kunststoffkammer. Die narkotisierten Tiere wurden dann auf einer beheizten Platte fixiert, um die Körpertemperatur bei 37°C zu halten. Über ein Schlauchsystem inhalierte das Tier weiterhin Isofluran durch Mund und Nase.

Daraufhin wurde die A.carotis dextra in Lagen freipräpariert und ein PE-50-Katheter in das Gefäßlumen eingeführt. Die Druckänderungen durch die im Gefäß pulssynchron schwankende Blutsäule wurden mittels eines Statham-Druck-Messers (AD Instruments GmbH) aufgezeichnet. Dasselbe Procedere wurde an der A.femoralis sinistra durchgeführt, so dass die Drücke in beiden Arterien simultan über 15 Minuten aufgezeichnet werden konnten.

2.7 Nekropsie

Nach Abschluss des jeweiligen Behandlungsintervalls (Placebo oder Sildenafil) von vier und neun Wochen erfolgte im Anschluss an plethysmographische und invasive Blutdruckmessungen in den jeweiligen Studien in allen Kollektiven eine Nekropsie mit Organentnahme. Zu Beginn wurde das Körpergewicht (KGW) des Tieres bestimmt. Mittels Einleitung von zweiprozentigem Isofluran in eine Kunststoffkammer wurde eine Inhalationsnarkose begonnen. Eine Incisur distal des Processus Xiphoideus eröffnete

die Haut und wurde beidseits nach lateral entlang des Rippenbogens vergrößert. Nach Eröffnung des Zwerchfells wurde das Herz durch Durchtrennung von V. cava superior und Aorta zügig exstirpiert und in Krebs-Henseleit-Lösung (siehe 6.4.1, Seite 92) überführt. Die nachfolgenden Präparationen erfolgten in dieser Lösung unter ständiger Carbogen-Begasung auf Eis.

Das Gesamt-Herzgewicht (HG), sowie die Gewichte von linkem (LV) und rechtem Ventrikel (RV) und der Lunge wurden nach vorausgegangener Präparation auf der Feinwaage (Sartorius Instruments) bestimmt. Gewebeproben von Lunge, LV und RV wurden für histologische und morphometrische Analysen in Formalin (siehe 6.4.1, Seite 92) fixiert. Der Rest der entnommenen Organe wurde bei -80°C gelagert.

Anschließend wurden rechte und linke Niere des Tieres inspiziert, um zystische Veränderungen der Nieren, aus denen eine arterielle Hypertonie resultieren könnte, auszuschließen. Zuletzt wurde die linke Tibia der Maus von dorsal präpariert. Dazu wurde im Kniegelenk unterhalb der Patella ein exartikulierender Schnitt mittels Skalpell durchgeführt und das obere Sprunggelenk am Ansatz der Tibia exartikuliert. Eine nachfolgende Längenmessung der Tibia diente der Abschätzung des Wachstums und Entwicklungsstandes der Tiere. Die Normalisierung von HG, LV, etc. auf die Tibialänge lieferte somit besser vergleichbare Daten als eine Normalisierung dieser Daten auf das KGW. Ein alleiniger Bezug dieser Parameter auf das KGW könnte in unserer Studie die Ergebnisse verfälschen, da die Funktionalität des Herz-Kreislauf-Systems insofern Einfluss auf das Körpergewicht der Tiere nimmt, als dieses bei einer Herzinsuffizienz mit generalisierten kardialen Ödemen zunehmen würde. Eine Dekompensation der Herzinsuffizienz als Folge der hämodynamischen Überbelastung durch TAC würde zu Körpergewichtsschwankungen führen. Daher wurden in den Studien die gewichtsabhängigen Parameter sowohl auf das KGW als auch auf die Tibialänge bezogen.

2.8 Histologische Analysen

Die histologische Analyse von Kardiomyozytendurchmesser und Kollagenfasergehalt lieferte das zellmorphologische Korrelat der echokardiographisch erfassten

Veränderungen der Herzkammern und der bei Nekropsie und Organentnahme beobachteten möglichen Differenzen der Herzgewichte zwischen den Gruppen.

Die in Formalin fixierten Gewebeprobeen wurden in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. Hideo A. Baba am Institut für Pathologie und Neuropathologie des Universitätsklinikums Duisburg-Essen in Essen in Paraffin eingebettet, geschnitten und gefärbt. Die Schnitte wurden mit Picro-Siriusrot zur Bestimmung des Kollagenfasergehaltes, mit der Perjodsäure-Schiff-Methode (PAS) zur Vermessung des Kardiomyozytendurchmessers sowie mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

2.8.1 Messung des linksventrikulären Kardiomyozytendurchmessers

Zur Messung des linksventrikulären Kardiomyozytendurchmessers im Rahmen der Dissertation wurde die Cell M-Software (Olympus) verwendet. Hierzu wurden mithilfe eines Farbkameraaufsatzes mit dem Mikroskop (Olympus, BX 41) bei 20facher Vergrößerung Bilder von den PAS-gefärbten Schnitten gemacht. In dieser Färbung sind die lipidreiche Zellmembran und der Zellkern gut zu erkennen. Der Durchmesser von etwa 100 Kardiomyozyten pro linken Ventrikel wurde auf Höhe des Zellkerns bestimmt.

2.8.2 Bestimmung des Kollagenfasergehaltes im linksventrikulären Gewebe

Der Kollagenfasergehalt der linken Ventrikel wurde an den Picro-Siriusrot-gefärbten Präparaten bestimmt. In der Studie zu den kardiovaskulären Wirkungen von Sildenafil an GC-A-defizienten Tieren wurde zusätzlich der Kollagenfasergehalt der rechten Ventrikel gemessen. Dabei wird zunächst ein zu vermessender Bereich bei 20facher Vergrößerung im Hellfeld ausgewählt, der frei von Gefäßen oder Randbereichen des Präparats ist. Anschließend wird das Gesichtsfeld unter einem Polarisationsfilter abgeleitet und mittels der KS 300 Software konnte aus dem Kontrast beider

aufgenommenen Bilder prozentual die Fläche der nun fluoreszierenden Kollagenfasern berechnet werden.

2.9 Western Blot

Die Western Blot Methode wurde zur Detektion von phosphoryliertem ERK (pERK) und ERK in linksventrikulärem Gewebe angewendet. ERK ist einer der zahlreichen Signalmediatoren, der abhängig vom Phosphorylierungszustand das Kardiomyozytenwachstum stimuliert. Des Weiteren wurden Troponin I (Tn I) und seine phosphorylierte Form nachgewiesen. Diese Proteine sind an der Kontraktion und Relaxation der Herzmuskelzelle beteiligt. Tn I wurde sowohl von der cAMP-aktivierten Proteinkinase A (PKA) als auch von der cGMP-aktivierten PKG I phosphoryliert (Blumenthal et al., 1978). Die im Western Blot verwendeten Lösungen, Gele, Antikörper, etc. sind im Abschnitt 6.4 (ab Seite 93) aufgeführt.

2.9.1 Homogenisierung des linksventrikulären Gewebes

Zur Homogenisierung wurde das Gewebe zunächst in einem in flüssigem Stickstoff auf -80°C gekühlten Zylinder gebrochen. Drei Spatelspitzen dieses Materials wurden mit $200\ \mu\text{l}$ auf 4°C gekühlten Puffer (Puffer für die Homogenisierung des linksventrikulären Gewebes, siehe 6.4.2, Seite 93) 90 Sekunden im Mikro-Dismembrator pulverisiert. Im Mikro-Dismembrator gefriert der Puffer, da die Gefäße des Dismembrators zunächst auch auf -80°C gekühlt wurden. Das entstandene Pulver wurde in ein auf Eis vorgekühltes Eppendorf-Gefäß überführt, in das $600\ \mu\text{l}$ Puffer vorgelegt wurden. Anschließend wurden Pulver und Puffer gut gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert, wobei das pulverisierte Gewebe darin gelöst wurde. Während dieser Inkubationszeit wurde das Homogenat alle 5 Minuten durchgemischt. Nach Zentrifugation ($9.600\ \text{G}$, $3\ \text{min}$, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und mehrmals durch eine Spritzenkanüle geschert.

Die solubilisierten Proteine wurden nach erneutem Zentrifugieren aus dem Überstand gewonnen und für das weitere Procedere bei -20°C gelagert.

2.9.2 Bestimmung des Proteingehaltes des linksventrikulären Gewebes

Der Proteingehalt dieses Lysats wurde mittels des Bichinchoninic Acid Assays (BCA, Uptima powered by Interchim, Montluçon Frankreich) bestimmt. Diese Methode beruht auf einer Farbreaktion der zu bestimmenden Proteine mit dem BCA-Reagenz (BCA-Reagenz A und 4 % Kupfersulfatlösung, im Verhältnis 50:1 gemischt). Die Farbreaktion liefert Absorptionsmaxima bei 562 nm, die im Photometer (Victor² Multi-Label Counter, Wallac) gemessen werden. Der Proteingehalt der Proben wurde mittels einer Eichkurve berechnet, die für jede Proteinmenge mit definierten Konzentrationen Rinderserumalbumin (BSA) in Puffer erstellt wird.

2.9.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Denaturierung der Proteine erfolgte durch Zugabe von zweifachem Lämmli-Puffer (siehe 6.4.2, Seite 93) für 10 Minuten bei 95°C. Für die Gelelektrophorese wurden ein 5 %iges Sammelgel und ein 12 %iges Trenngel verwendet (siehe 6.4.3, Seite 93). Anschließend erfolgte die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht in einem Stromfeld für 2,5 Stunden. Der Transfer auf Nitrozellulosefolie wurde bei 80 V, 150 W und 2 mA pro cm² Nitrozellulosefolie für 50 Minuten in Transferpuffer (siehe 6.4.3, Seite 94) durchgeführt.

2.9.4 Detektion von Zielproteinen und Quantifizierung

Nach Waschen der Zellulosefolie mit Tris-gepufferter Salzlösung (TBS, siehe 6.4.3, Seite 94) wurde diese für 2 Stunden bei Zimmertemperatur mit einer Lösung aus 5 % Magermilchpulver in TBS-Tween (siehe 6.4.3, Seite 94) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Im Anschluss an drei Waschgänge mit TBS-Tween wurde mit dem jeweiligen Erstantikörper über Nacht inkubiert. Der Erstantikörper (siehe 6.4.4, Seite 95) war gegen das nachzuweisende Zielprotein, d. h. gegen ein Epitop der Zielproteine pERK, ERK, pTn I und Tn I gerichtet. Zur Inkubation wurden diese verschiedenen Erstantikörper jeweils im Verhältnis 1:1000 zugegeben.

Die überschüssige Antikörperlösung wurde abgenommen. Anschließend wurde die Nitrozellulosefolie dreimal 5 Minuten in TBS-Tween gewaschen und für mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur mit einem sekundären Antikörper inkubiert. Da alle verwendeten Erstantikörper polyclonale Antikörper aus Kaninchen waren, richtete sich der Zweitantikörper gegen IgG-Antikörper des Kaninchens (siehe 6.4.4, Seite 95). Die Inkubation erfolgte in einer Lösung aus 5 % Magermilchpulver in TBS-Tween, welcher der zweite Antikörper in einem Verhältnis von 1:10.000 zugegeben wurde. Nach der Inkubation wurde diese Lösung abgenommen und die Folie anschließend zweimal für 5 Minuten in TBS-Tween und einmal für 5 Minuten in TBS gewaschen. Der Zweitantikörper war mit Meerrettich-Peroxidase-Enzymaktivität versehen, wodurch später in der Reaktion mit dem ECL Western Blotting Substrate (Pierce) eine Schwärzung des Röntgenfilms (Amersham Hyperfilm, GE Healthcare Limited, UK) durch Chemilumineszenz erreicht wurde.

Die densitometrische Auswertung der Filme erfolgte mit der Image-J-Software (National Institutes of Health). Hierfür wurden die Röntgenfilme mit einem herkömmlichen Scanner eingescannt und die Bandenschwärzung quantitativ nach Abzug des Hintergrunds berechnet.

2.10 Messung des zyklischen Guanosinmonophosphat-Gehaltes im Gewebe

Die Messungen des cGMP-Gehaltes in Gewebeproben des linken Ventrikels und der Lunge erfolgten mittels eines Radioimmunoassays (RIA).

Verwendete Lösungen, Puffer etc. sind unter 6.4.5, Seite 95 aufgeführt.

2.10.1 Homogenisierung des Gewebes

Das intrazelluläre cGMP wurde in 70%igem Ethanol (v/v) extrahiert. Das jeweilige Gewebe (linker Ventrikel, Lunge) wurde dazu in einem mittels Stickstoff gekühlten Zylinder gebrochen und 2 min bei einer Schüttelfrequenz von 2000 pro min und einer Schüttelamplitude von 16 mm in auf -80°C gekühlten Gefäßen im Mikro-Dismembrator pulverisiert. Dieses Pulver wurde in 400 µl eiskalten, 70%igen unvergällten Ethanol (v/v) überführt.

Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 4°C und gründlichem Durchmischen wurden die Zelllysate (13800 G, 10 min, 4°C) zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde dieser in der Vakuumzentrifuge eingeeengt und anschließend in 400 µl Natriumacetat (50 mM, pH 6,0) aufgenommen. Aus diesen Proben wurde mittels RIA der cGMP-Gehalt bestimmt.

Aus den durch Zentrifugation der Zelllysate (siehe oben) entstandenen Pellets wurde das verbliebene Ethanol bei 37°C abgedampft. Die Pellets wurden in Lysispuffer (siehe 6.4.2, Seite 92) aufgenommen und mittels Ultraschallwellen homogenisiert. Aus diesem Homogenat wurde analog der oben beschriebenen BCA-Assay-Methode der Proteingehalt bestimmt.

2.10.2 Durchführung des Radioimmunoassays

Die Radioimmunoassays wurden mit Unterstützung von Frau Birgit Gassner und Frau Alexandra Gazinski durchgeführt.

Das Messprinzip des Radioimmunoassays (RIA) beruht auf einer Kompetition - in diesem Falle zwischen radioaktiv markiertem cGMP und cGMP aus dem Zelllysate - um die Bindung an einen Antikörper mit hoher Spezifität und Affinität zu cGMP (Thomas L., 1998).

Die Proben wurden acetyliert, um die Affinität des Antikörpers zu cGMP zu erhöhen. Der Antikörper wurde durch Immunisierung eines Kaninchens mit succinyliertem cGMP gewonnen (Steiner et al., 1972). Aufgrund der Ähnlichkeit des Succinats mit dem Acetatrest, bindet der Antikörper acetyliertes cGMP mit höherer Affinität als nicht-acetyliertes cGMP.

Nach Zentrifugation (16,2 G, 5 min, 20°C) wurden die Proben in RIA-Reagenzgläser überführt und 15 % γ -Globulin und Antikörper-Verdünnungslösung (Antikörper im Verhältnis 1:2500 in 0,15 % γ -Globulin) zugegeben.

Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten im Radioaktivlabor des Physiologischen Institutes. Hier wurde der Tracer ($^{125}\text{J-cGMP}$), in Natriumacetat (50 mM, pH 6: siehe 6.4.5, Seite 95) verdünnt, beigemischt. Nach erneuter Zentrifugation (216 G, 4 min, 4°C) wurde für mindestens 12 Stunden bei 4°C inkubiert.

Durch Zugabe von 0,15 % γ -Globulin und 15 % Polyethylenglycol in 10 mM TRIS HCl, pH 7,4 (siehe 6.4.5, Seite 95) und Inkubation für weitere 15 Minuten bei 4°C erfolgte eine Trennung des freien $^{125}\text{J-cGMP}$ von Antikörper-gebundenem $^{125}\text{J-cGMP}$ durch Zentrifugation (3452 G, 10 min, 4°C). Der dadurch entstandene Überstand wurde bis auf ein Sediment, welches die Antigen-Antikörper-Komplexe enthielt, mittels einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Im γ -Counter wurde die radioaktive Strahlung dieser Pellets in counts per minute gemessen.

Der cGMP-Gehalt der Proben errechnete sich anhand der Standarddeichkurve, die aus Standardproben mit definiertem cGMP-Gehalt ermittelt wurde. Der cGMP-Gehalt im linksventrikulären und pulmonalen Gewebe wurde auf den zuvor bestimmten Proteingehalt bezogen.

2.11 Bestimmung der Plasmakonzentrationen von Sildenafil

Zur Kontrolle der Plasmaspiegel nach oraler Applikation des Pharmakons Sildenafil wurden zusätzlich wildtypische Mäuse aus dem Institut zwei Wochen lang mit durchschnittlich 150 - 240 mg Sildenafil pro kg Körpergewicht pro Tag behandelt. Hierfür wurde in Futterpellets gepresstes Sildenafil (1g Sildenafil pro kg Futter) verfüttert. Diese Dosis entsprach der Tagesdosis, die in vergleichbaren Studien appliziert wurde (Nagayama et al., 2009). Anschließend wurden Plasmaproben von diesen Tieren gewonnen. Aufgrund der oben beschriebenen Pharmakokinetik von Sildenafil und der gewählten Lichtperiode (7.00-19.00 Uhr) wurden die Plasmaproben entsprechend den Fressgewohnheiten der Tiere zwischen 8.00 und 8.15 Uhr gewonnen. Die Narkoseführung und Präparation wurde wie unter 2.7 (Nekropsie) beschrieben durchgeführt. Anschließend wurde mit einer 23 G-Kanüle der linke Ventrikel punktiert und Blut aspiriert. Dieses wurde in ein mit Kalium-EDTA beschichtetes Röhrchen überführt und auf Eis gestellt. Nach Zentrifugation (4000 G, 4 min, 4°C) wurde das überstehende Plasma abgenommen, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und bei -20°C konserviert.

Die Plasmaspiegel von Sildenafil und N-desmethyltem Sildenafil wurden im Labor von Dr. Allan Xu (Keystone Analytical Inc., North Wales, USA) bestimmt. Die Bestimmung der Plasmaspiegel war insbesondere wichtig, da die Metabolisierungsrate von Sildenafil in Nagern über der Rate im Menschen liegt. Es galt zu überprüfen, ob die mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀), die für Sildenafil im Nager bei 3,5 nM liegt (Giordano et al., 2001), mittels oraler Applikation des Pharmakons über Futterpellets erreicht wurde.

2.12 Statistische Auswertung

Für die Statistische Auswertung der Daten wurden Microsoft Excel™ und SPSS 14.0 verwendet. Dabei wurden die Mittelwerte (MW), sowie Standardabweichungen (SD) und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) in Excel berechnet. Alle weiteren

statistischen Analysen erfolgten in SPSS 14.0, wobei jeweils ein p-Wert unter 0,05 als statistisch signifikant betrachtet wurde.

Aufgrund der Beschaffenheit der Datensätze, einem vergleichsweise geringen Stichprobenumfang und keiner gegebenen Normalverteilung der Daten, wurden nichtparametrische, verteilungsfreie Testverfahren für die weitere statistische Analyse ausgewählt. Diese Verfahren haben den Vorteil, voraussetzungsärmer gegenüber parametrischen Verfahren zu sein, d. h. hier ist lediglich eine Stetigkeit der Variablen sowie Homomertität der Populationsverteilungen zu erfüllen (Bortz J., 2003).

Zum Vergleich aller unabhängigen Gruppen zu einem Zeitpunkt wurde der H-Test von Kruskal-Wallis verwendet. Bestand ein signifikanter Unterschied im Vergleich der zentralen Tendenzen im H-Test, so wurden anschließend die Gruppen im Mann-Whitney-U-Test untereinander verglichen. Im Vergleich zum Mediantest schöpft dieser Test die Ranginformationen vollständig aus und hat daher eine höhere Teststärke (Bortz J., 2005).

Um die Entwicklung von Parametern über den Behandlungszeitraum in einem Kollektiv zu beobachten, wurde zunächst eine Rangvarianzanalyse nach Friedman für verbundene Stichproben angewendet, sofern es mehr als zwei Beobachtungszeitpunkte gab. Als Post-Hoc Verfahren oder alleiniger Test bei zwei Behandlungszeitpunkten wurde der Vorzeichenrangtest nach Wilcoxon für zwei verbundene Stichproben angewandt.

3 Ergebnisse

3.1 Monitoring der Pharmakotherapie mit Sildenafil

3.1.1 Kontrolle der Pharmakonaufnahme über das Futter

Über die Messung der täglichen Futterraufnahme wurde die aufgenommene Menge an Sildenafil für die behandelten Kollektive errechnet. Sie diente auch als indirekter Indikator für den Gesundheitszustand und das Wohlbefinden des Tieres. Die mit Sildenafil behandelten Tiere, die zuvor eine operative Stenosierung der Aorta erhielten, nahmen durchschnittlich 155 ± 9 mg Sildenafil/kg KGW pro Tag zu sich, wobei die Nahrungsaufnahme über den Behandlungszeitraum konstant blieb. Die Tiere, die Placebofutter erhielten, nahmen durchschnittlich die gleiche Menge an Futter zu sich.

Die mit Sildenafil behandelten GC-A $+/+$ und GC-A $-/-$ Tiere nahmen durchschnittlich täglich 243 ± 31 mg Sildenafil/kg KGW pro Tag zu sich. Auch hier war die Nahrungsaufnahme keinen größeren Schwankungen unterworfen. Der durchschnittliche Tagesverzehr von Sildenafilfutter und Placebofutter in den Kollektiven war nicht signifikant unterschiedlich.

3.1.2 Ergebnisse der exemplarischen Plasmaspiegelbestimmung

Die im Blutplasma zirkulierende Menge an Sildenafilcitrat betrug durchschnittlich $42,73 \pm 5,31$ ng/ml (entspricht 60 ± 8 nM), die Konzentration des desmethylierten Sildenafils $23,97 \pm 4,67$ ng/ml (entspricht 40 ± 7 nM). Die Plasmakonzentration lag damit deutlich über der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC₅₀) von Sildenafil, die 3,5 nM beträgt (Giordano et al., 2001).

3.2 Studie 1: Effekte von Sildenafil in einem murinen Modell der Herzhypertrophie nach Transverser Aortenkonstriktion

3.2.1 Blutdruckmessungen und Nekropsiedaten

Ziel dieser Studie war es, die kardialen Effekte von Sildenafil bei druckinduzierter, funktionell kompensierter linksventrikulärer Herzhypertrophie zu testen. Die Nachlast des linken Ventrikels wurde durch eine operativ herbeigeführte Konstriktion der Aorta transversalis (TAC) gesteigert. Vergleichende invasive Messungen des Blutdruckes in der A. carotis dextra (proximal der Stenose) zeigten im Mittel einen Anstieg des systolischen Blutdruckes (SBD) um 35,89 mmHg bei TAC-operierten Tieren im Vergleich zu den Sham-operierten Tieren. Die Mäuse, die nach TAC mit Sildenafil behandelt wurden, hatten im Mittel in der A. carotis dextra einen um 23,55 mmHg erhöhten SBD. Betrachtet man die Differenz zwischen dem SBD in der A. carotis dextra und der A. femoralis sinistra, lässt sich nahezu kein Blutdruckabfall im Kontrollkollektiv mit Sham-Operation feststellen, dafür aber eine Druckdifferenz von $57,05 \pm 17,72$ mmHg für Placebo-behandelte und von $44,66 \pm 9,72$ mmHg für Sildenafil-behandelte, TAC-operierte Tiere (siehe Abb. 13). Der Blutdruckgradient war in beiden Kollektiven mit Aortenstenose statistisch signifikant und belegt damit die erfolgreiche TAC.

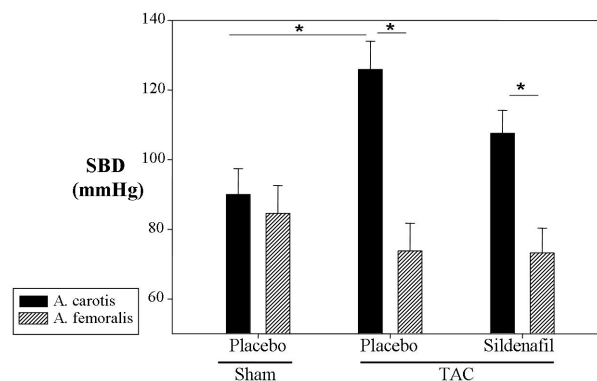


Abb. 13: Systolischer Blutdruck (SBD, in mmHg) in A. carotis dextra und A. femoralis sinistra.

Diese Messungen zeigen, dass der linke Ventrikel durch die operative Stenosierung (TAC) im Mittel um zusätzliche 36 mmHg (Placebo-Gruppe) bzw. 24 mmHg (Sildenafil-Gruppe) belastet wurde. N = 7 pro Gruppe, abgebildet ist jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler. * kennzeichnet einen p-Wert von $\leq 0,05$.

Die Übersicht über die bei Nekropsie und Organentnahme gewonnenen Daten (siehe Tabelle 3, Seite 47) zeigt zunächst, dass zwischen den Kollektiven keine signifikanten Schwankungen bezüglich des Körpergewichtes und der Tibialänge bestanden, mögliche Veränderungen der Herzgewichte (unter TAC oder Therapie mit Sildenafil) also gut zu beurteilen waren. Bei Betrachtung des linksventrikulären, sowie des Gesamtherzgewichtes (siehe Abb. 14) wird deutlich, dass die Tiere unter Aortenkonstriktion eine signifikante Vergrößerung des LV (siehe Abb. 15) entwickelten. Bezieht man das Herzgewicht und das linksventrikuläre Gewicht auf die Tibialänge wird zudem ersichtlich, dass die druckinduzierte Herzvergrößerung durch Behandlung mit Sildenafil nicht signifikant beeinflusst wurde. Im Gegenteil, tendenziell war die Zunahme des LV-Gewichtes und des Herzgewichtes in der mit Sildenafil behandelten Gruppe sogar ausgeprägter als in der unbehandelten Gruppe (siehe Abb. 14 und 15). Dies ist insbesondere erstaunlich, da die Nachlaststeigerung in der mit Sildenafil behandelten Gruppe geringer war (siehe Abb. 13).

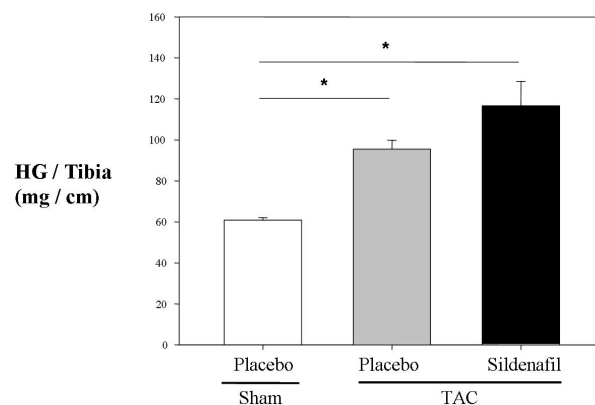


Abb. 14: Herzgewicht (HG, in mg) bezogen auf die Tibialänge (in cm). Das Verhältnis von HG zur Tibialänge stieg für die Tiere mit Transverser Aortenkonstriktion (TAC) signifikant an. Zwischen behandelten und unbehandelten Tieren bestand kein Unterschied. N = 7 pro Gruppe, abgebildet ist jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler. * kennzeichnet einen p-Wert von $\leq 0,05$.

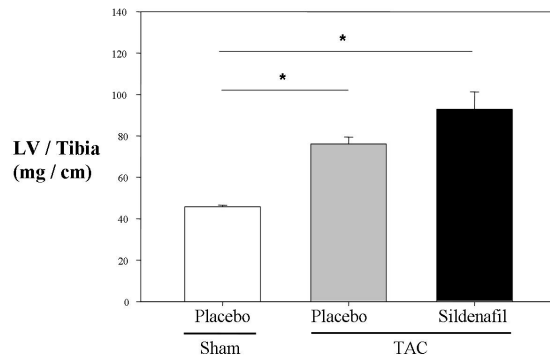


Abb. 15: Gewicht des linken Ventrikels (LV, in mg) bezogen auf die Tibialänge (in cm). Die Ratio LV zu Tibialänge stieg nach Transverser Aortenkonstriktion (TAC) signifikant an. Dabei bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Placebo- bzw. Sildenafil-behandelten Tieren. N = 7 pro Gruppe, abgebildet ist jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler. * kennzeichnet einen p-Wert von $\leq 0,05$.

Bezieht man die Ratio LV zu Tibia zusätzlich auf den prästenotischen systolischen Blutdruck, so ist dieser Quotient lediglich für Sildenafil-behandelte Tiere signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht (siehe Abb. 16). Dies spiegelt eine größere Zunahme des linksventrikulären Gewichtes trotz einer geringeren Steigerung des Blutdruckes und der Nachlast, die auf den Ventrikel einwirkt, wieder.

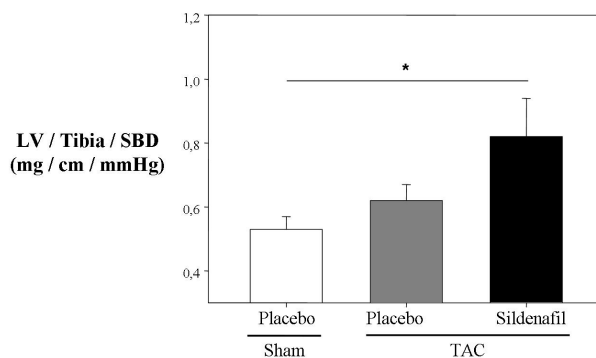


Abb. 16: Gewicht des linken Ventrikels (LV, in mg) bezogen auf die Tibialänge (in cm), normiert auf den systolischen Blutdruck in der A. carotis dextra (in mmHg).

Die Ratio LV zu Tibialänge zu SBD stieg nach Transverser Aortenkonstriktion (TAC) nur für Sildenafil behandelte Tiere signifikant an. Dabei bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Placebo- bzw. Sildenafil-behandelten Tieren. N = 7 pro Gruppe, abgebildet ist jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler.* kennzeichnet einen p-Wert von $\leq 0,05$.

Das Lungenfeuchtgewicht und die Ratio Lungengewicht zu Tibiallänge stiegen bei den operierten Tieren signifikant an. Eine Zunahme des Lungenfeuchtgewichtes über den Behandlungszeitraum von vier Wochen ist in diesem Studienmodell als Zeichen einer leichten LV-Insuffizienz zu werten (siehe Abb. 17). Das Lungenfeuchtgewicht war in der mit Sildenafil behandelten Gruppe zwar deutlich erhöht, dies war allerdings nicht statistisch signifikant.

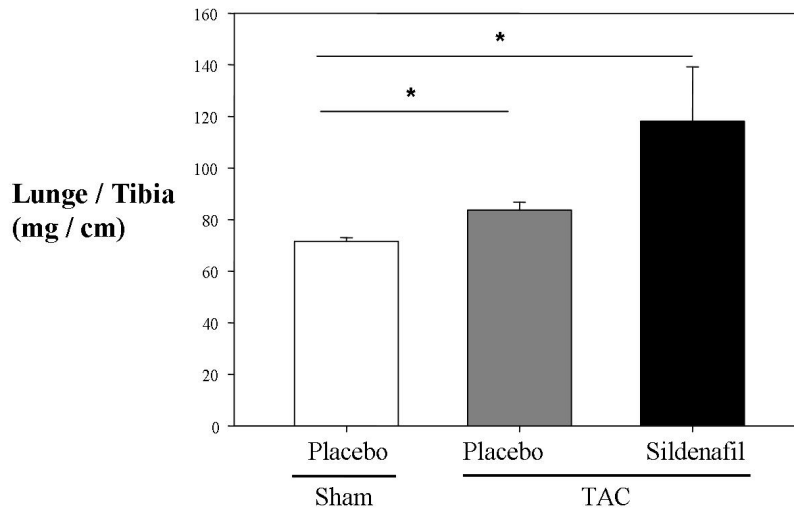


Abb. 17: Lungenfeuchtgewicht (Lunge, in mg) bezogen auf die Tibialänge (in cm).

Die Ratio Lunge zu Tibialänge stieg nach Transverser Aortenkonstriktion (TAC) signifikant an. Dabei bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Placebo- bzw. Sildenafil-behandelten Tieren. N = 7 pro Gruppe, abgebildet ist jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler. * kennzeichnet einen p-Wert von $\leq 0,05$.

Tabelle 3: Durch Nekropsie und invasive Blutdruckmessung gewonnene Daten.

KGW = Körpergewicht, SBD = Systolischer Blutdruck, Δ SBD = Mittelwert aller ermittelten Differenzen zwischen SBD der A. carotis dextra (= A. car.) und A. femoralis sinistra (= A. fem.), MW = Mittelwert, SEM = Standardfehler. * steht für einen signifikanten Unterschied zu Sham-operierten Tieren, die Signifikanzen wurden im Mann-Whitney-U-Test ermittelt.

Operations- technik	Sham	TAC	
		Placebo	Sildenafil
Behandlung	Placebo	Placebo	Sildenafil
	<u>MW</u> \pm SEM	<u>MW</u> \pm SEM	<u>MW</u> \pm SEM
KGW (g)	24 \pm 1	28 \pm 1	29 \pm 1
Tibiallänge (cm)	1,85 \pm 0,02	1,87 \pm 0,06	1,81 \pm 0,02
Herzgewicht [HG] (mg)	113 \pm 3	178 \pm 9 *	211 \pm 22 *
LV-Gewicht (mg)	85 \pm 2	142 \pm 7 *	168 \pm 16 *
RV-Gewicht (mg)	20 \pm 1	23 \pm 3	23 \pm 3
Lungen- feuchtgewicht (mg)	132 \pm 4	156 \pm 5 *	213 \pm 41 *
SBD A. car. (mmHg)	90 \pm 7	126 \pm 8 *	108 \pm 7
SBD A. fem. (mmHg)	85 \pm 8	74 \pm 8	73 \pm 7
Δ SBD	8 \pm 13	57 \pm 18 *	45 \pm 10 *
HG / Tibia (mg / cm)	61 \pm 1	96 \pm 4 *	117 \pm 12 *
HG / KGW ($\times 10^{-3}$)	5 \pm 0,1	6 \pm 0,2 *	7 \pm 0,7 *
LV / Tibia (mg / cm)	46 \pm 1	76 \pm 3 *	93 \pm 8 *
LV / KGW ($\times 10^{-3}$)	3 \pm 0,1	5 \pm 0,2 *	6 \pm 0,46 *
RV / Tibia (mg / cm)	11 \pm 1	13 \pm 1	12 \pm 1
RV / KGW ($\times 10^{-3}$)	0,8 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1	0,8 \pm 0,1
Lunge / Tibia (mg / cm)	72 \pm 1	84 \pm 3 *	118 \pm 21 *
Lunge / KGW ($\times 10^{-3}$)	5 \pm 0,1	6 \pm 0,2	7 \pm 1

3.2.2 Echokardiographie

Die Echokardiographie gewährt als bildgebendes Verfahren einen Einblick in die Entwicklung kardialer Parameter während der andauernden Behandlung (siehe Tabelle 4). Zwei Wochen nach TAC war die deutliche Veränderung einiger Parameter zu verzeichnen, die jedoch zwischen der Sildenafil- und der Placebo-Gruppe keine signifikanten Unterschiede aufwiesen. Zu diesem Zeitpunkt der Studie wurde deutlich, dass TAC zu einer Hypertrophie des LV führt. Dies wurde an der Zunahme der Wanddicken des Interventrikulären Septums (IVS) und der Hinterwand (PW) in Systole (S) und Diastole (D) ersichtlich (siehe Abb. 17).

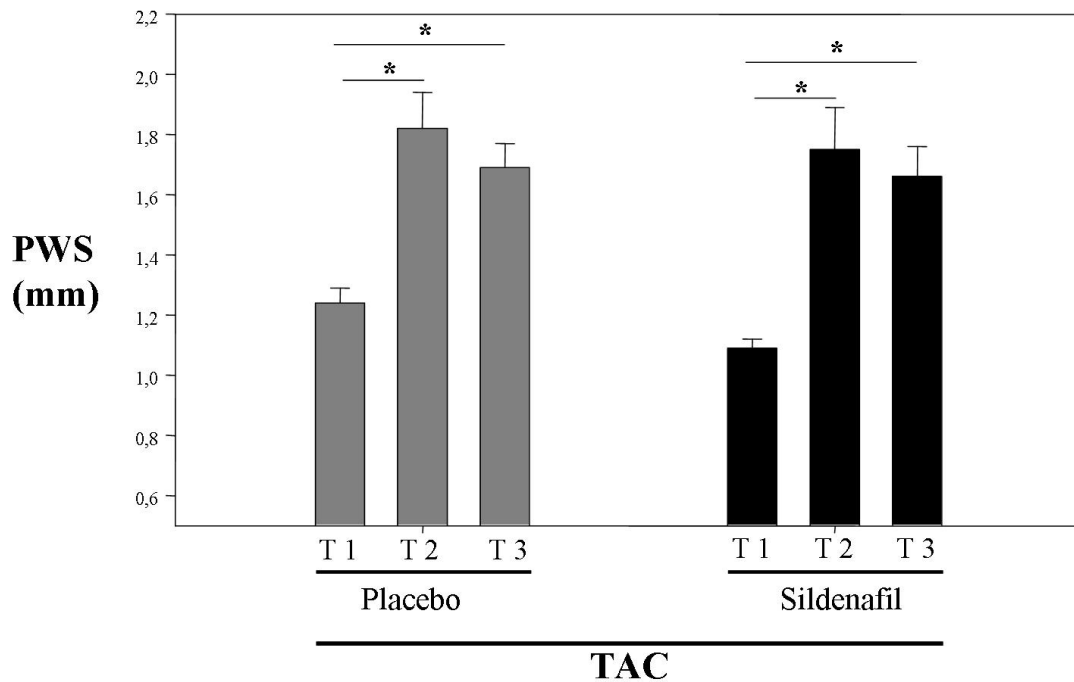


Abb. 17: Echokardiographische Vermessung der Hinterwand des LV in der Systole (PWS, in mm) im Studienverlauf.

T1 bis 3 bezeichnet die drei Aufnahmezeitpunkte, vor (T1), bzw. zwei (T2) und vier Wochen (T3) nach Behandlungsbeginn. Es zeigte sich eine deutliche Zunahme der Dicke der Hinterwand nach Transverser Aortenkonstriktion (TAC). Zum Ende des Behandlungsintervalls war eine rückläufige Tendenz dieser Entwicklung zu erkennen. N = 7 pro Gruppe, abgebildet ist jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler.* kennzeichnet einen p-Wert von $\leq 0,05$ berechnet im Wilcoxon-Rang-Test.

Es entwickelte sich in den Tieren nach TAC eine konzentrische Hypertrophie mit konsekutiver, deutlicher Verkleinerung des Kammervolumens. Dies zeigte sich an einer Abnahme des EDD und ESD (siehe Abb. 18), sowie der Abnahme des enddiastolischen sowie endsystolischen Volumens (EDV, ESV). Die Behandlung mit Sildenafil hatte keinen signifikanten Einfluss auf diese Parameter.

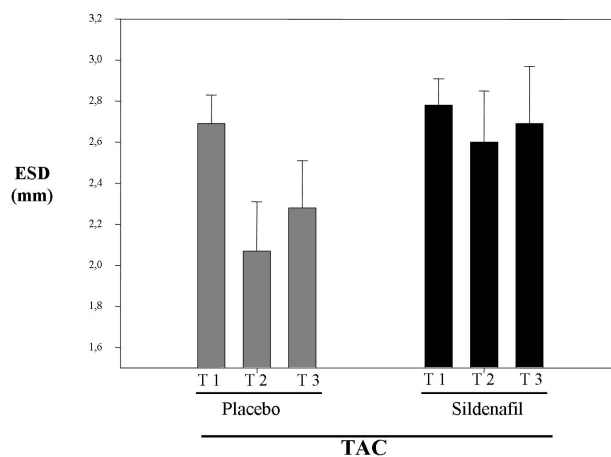


Abb. 18: Echokardiographische Vermessung des endsystolischen Diameters (ESD, in mm). T1 bis 3 bezeichnet die drei Aufnahmezeitpunkte, vor, zwei und vier Wochen nach Behandlungsbeginn. Die Verkleinerung des ESD zu T 2 ist Ausdruck der konzentrischen Herzhypertrophie nach TAC (Transverse Aortenkonstriktion). Zu T 3 trat eine leichte Vergrößerung auf, Ausdruck einer möglichen beginnenden Dilatation des Ventrikels. Diese Veränderungen waren zu keinem Zeitpunkt signifikant. N = 7 pro Gruppe, abgebildet ist jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler.

Allerdings zeugt der geringere Rückgang des EDV im Sildenafil-Kollektiv auch von einer im Vergleich besseren diastolischen Herzfunktion der mit Sildenafil behandelten Tiere (siehe Abb. 19). Diese verbesserte diastolische Funktion kann an der cGMP-vermittelten Phosphorylierung von Titin durch die PKG I liegen (Kruger et al., 2009). Dies würde einer beginnenden Versteifung der Myofibrillen bei der Myokardhypertrophie entgegenwirken und somit in einer verbesserten Relaxationsfähigkeit des Ventrikels und konsekutiv eines höheren EDV resultieren. Vier Wochen nach TAC stiegen allerdings auch in der Sildenafil-Gruppe EDV, ESD

und EDD (siehe Abb. 18 und 19). Betrachtet man dazu parallel den Verlauf des Schlagvolumens (SV) und der Ejektionsfraktion (EF) zum Zeitpunkt der dritten Aufnahme, so sieht man, dass die Herzfunktion sich nun auch im Sildenafil-Kollektiv verschlechtert hatte.

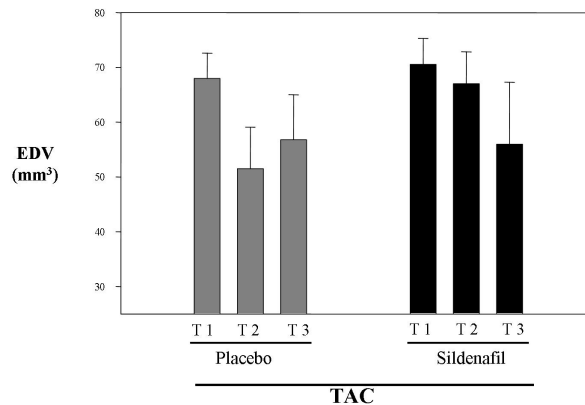


Abb. 19: Berechnung des enddiastolischen Volumens (EDV, in mm³) des linken Ventrikels anhand echokardiographisch ermittelter Parameter.

T1 bis 3 bezeichnet die drei Aufnahmezeitpunkte, vor, zwei und vier Wochen nach Behandlungsbeginn. Die Abnahme des EDV zu T 2 ist Ausdruck einer Verschlechterung der diastolischen Funktion. Diese Abnahme war im Sildenafil-Kollektiv geringer ausgeprägt, vier Wochen nach TAC fiel jedoch auch hier das EDV ab. Diese Veränderungen waren zu keinem Zeitpunkt signifikant. N = 7 pro Gruppe, abgebildet ist jeweils der Mittelwert ± Standardfehler.

Zum Ende des Behandlungsintervalls gilt festzustellen, dass Sildenafil keine signifikanten Veränderungen der Parameter gegenüber der Placebo-Behandlung hervorgerufen hat. Es zeigte sich jedoch im Vergleich zu den anderen Aufnahmezeitpunkten eine Dynamik der Parameter. Diese Beobachtungen sind kongruent mit dem Verlauf der EF, des SV und des HZV. Die EF stieg zum Zeitpunkt 2 an (siehe Abb. 20). Grund hierfür könnte ein Adaptionsmechanismus des Organismus sein. Kompensatorisch kommt es hierbei zu einer Steigerung der Auswurfraction um der zusätzlichen Belastung durch die Stenose im Ausflusstrakt entgegenzuwirken und den Kreislauf stabil zu halten. Daher blieben SV und HZV konstant. Die chronische Mehrbelastung des Herzens überstieg nach gewisser Zeit die Kompensationsfähigkeit des Herzens. Daher zeigte sich tendenziell nach vier Wochen ein Rückgang der EF. HZV und SV blieben konstant.

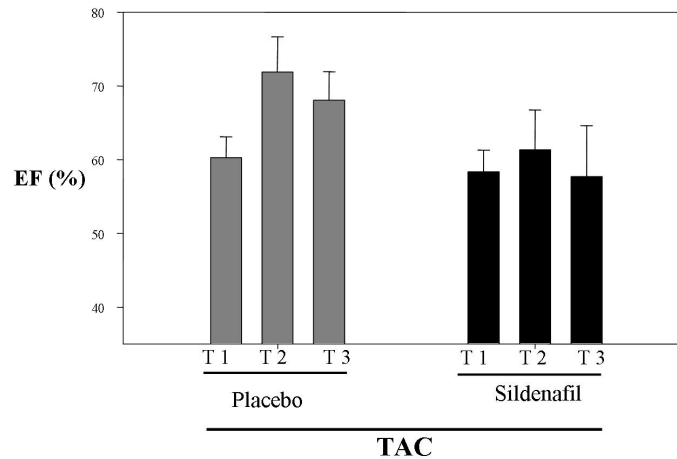


Abb. 20: Berechnung der Ejektionsfraktion des linken Ventrikels (EF, in %) anhand echokardiographisch ermittelter Parameter.

T1 bis 3 bezeichnet die drei Aufnahmezeitpunkte, vor, zwei und vier Wochen nach Behandlungsbeginn. Die EF stieg nach Transverser Aortenkonstriktion (TAC) an, in den mit Sildenafil behandelten Tieren allerdings deutlich schwächer. Vier Wochen nach TAC war diese Entwicklung wieder rückläufig, im Sildenafil-behandelten Kollektiv sank die EF sogar leicht unter das Ausgangsniveau. Die Veränderungen der EF waren statistisch nicht signifikant. N = 7 pro Gruppe, abgebildet ist jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler.

Die Berechnung der LV-Masse liefert kongruente Ergebnisse: zwei Wochen nach TAC stieg sie bei allen operierten Tieren an, vier Wochen nach TAC verzeichnete die mit Placebo behandelte Gruppe eine weitere Massenzunahme und die Sildenafil-behandelte Gruppe eine Massenabnahme im Vergleich zum zweiten Zeitpunkt der echokardiographischen Untersuchungen.

Die echokardiographischen Untersuchungen beweisen, dass die TAC erfolgreich war. Die vermessenen Parameter zeigen eine durch TAC hervorgerufene Druckbelastung auf den linken Ventrikel. Eine signifikante Veränderung der Parameter hinsichtlich einer Verbesserung der kardialen Funktionen, sowie ein Rückgang des kompensatorischen Kardiomyozytenwachstums (soweit in dieser bildgebenden Untersuchungstechnik beurteilbar), konnte durch Behandlung mit Sildenafil nicht erreicht werden.

Tabelle 4: Echokardiographisch vermessene und berechnete Parameter.

Aufnahme 1 wurde vor Behandlungsbeginn angefertigt, Aufnahme 2 zwei Wochen nach, und Aufnahme 3 vier Wochen nach Transverser Aortenkonstriktion. EF, EDV, ESV und Masse wurden nach Teichholz berechnet. 2D FS = Fraktionelle Verkürzung der Hinterwand, gemessen im 2D-Modus. Alle anderen Parameter wurden im M-Modus vermessen. § steht für eine signifikante Änderung des Parameters im Vergleich zum Aufnahmezeitpunkt 1. Die Behandlung mit Sildenafil ergab keine signifikanten Veränderungen.

	Aufnahme 1		Aufnahme 2		Aufnahme 3	
	Placebo	Sildenafil	Placebo	Sildenafil	Placebo	Sildenafil
	MW ± SEM	MW ± SEM	MW ± SEM	MW ± SEM	MW ± SEM	MW ± SEM
2D FS (%)	65,16 ± 4,20	58,86 ± 6,24	74,28 ± 4,26	66,21 ± 6,99	72,73 ± 3,34	57,50 ± 7,63
IVS D (mm)	0,82 ± 0,07	0,91 ± 0,02	1,23 ± 0,06 §	1,15 ± 0,09	1,29 ± 0,05 §	1,28 ± 0,05 §
EDD (mm)	3,94 ± 0,12	4,00 ± 0,11	3,47 ± 0,20	3,90 ± 0,15	3,62 ± 0,21	3,86 ± 0,18
PWD (mm)	0,84 ± 0,03	0,79 ± 0,02	1,26 ± 0,11 §	1,22 ± 0,04 §	1,24 ± 0,07 §	1,19 ± 0,05 §
IVS S (mm)	1,30 ± 0,06	1,30 ± 0,04	1,71 ± 0,03 §	1,61 ± 0,06 §	1,92 ± 0,06 §	1,79 ± 0,03 §
ESD (mm)	2,69 ± 0,14	2,78 ± 0,13	2,07 ± 0,24	2,60 ± 0,25	2,28 ± 0,23	2,69 ± 0,28
PW S (mm)	1,24 ± 0,05	1,09 ± 0,03	1,82 ± 0,12 §	1,75 ± 0,14 §	1,69 ± 0,08 §	1,66 ± 0,10 §
EDV (mm ³)	68,00 ± 4,61	70,57 ± 4,72	51,51 ± 7,59	67,01 ± 5,84	56,79 ± 8,22	55,99 ± 11,30
ESV (mm ³)	27,48 ± 3,29	29,78 ± 3,35	15,97 ± 5,02	26,70 ± 4,63	19,59 ± 5,07	25,36 ± 7,13
SV (ml)	0,04 ± 0,0034	0,04 ± 0,0026	0,04 ± 0,0034	0,04 ± 0,0034	0,04 ± 0,0035	0,03 ± 0,0059
HZV (ml/min)	22,65 ± 1,60	21,38 ± 1,37	20,04 ± 1,68	23,27 ± 2,29	22,45 ± 1,94	18,29 ± 3,80
EF (%)	60,27 ± 2,85	58,37 ± 2,94	71,86 ± 4,81	61,34 ± 5,40	68,06 ± 3,87	57,70 ± 6,93
Masse (mg)	184,71 ± 8,47	195,78 ± 10,77	226,36 ± 21,37	265,58 ± 27,05 §	250,59 ± 26,75	232,48 ± 46,22

3.2.3 Histologische Analysen

3.2.3.1 Vermessung des Kardiomyozytendurchmessers als morphologisches Korrelat der Herzhypertrophie

Die Messung der Kardiomyozytendurchmesser (KMD) des linken Ventrikels gestattet eine Vervollständigung der Ergebnisse der Nekropsie und Echokardiographie auf zellmorphologischer Ebene (siehe Abb. 21).

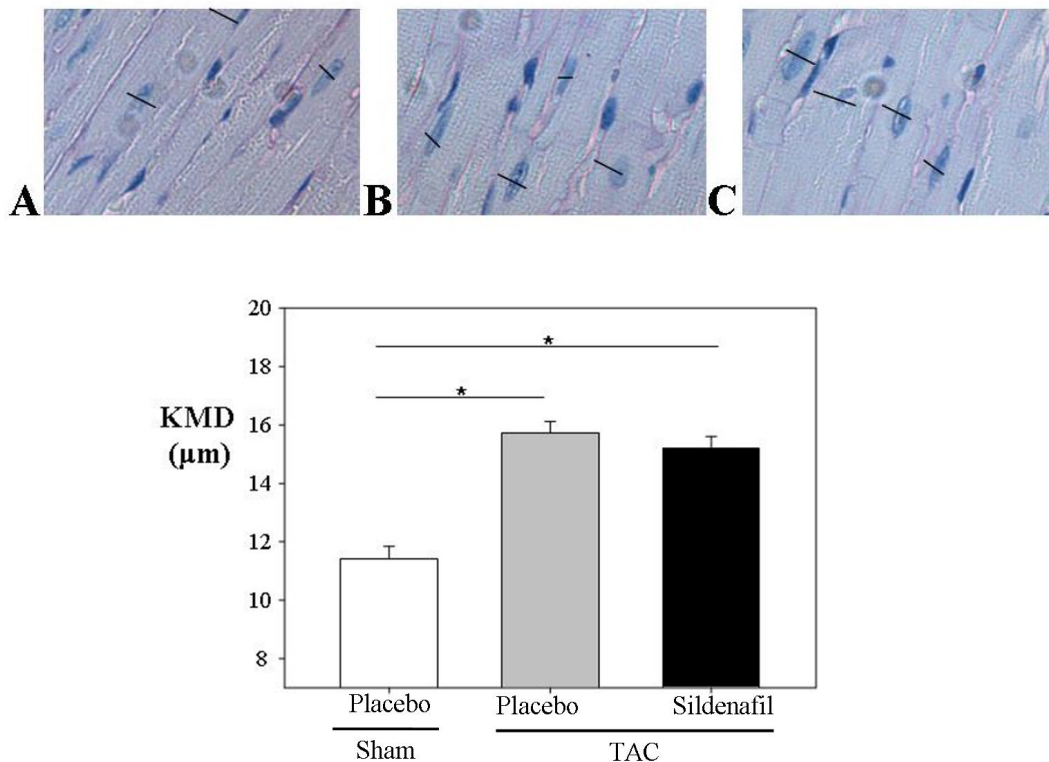


Abb. 21: Kardiomyozytendurchmesser des LV (KMD, in µm).

Die obere Abbildung, (A-C) zeigt eine exemplarische Darstellung der Vermessung des Kardiomyozytendurchmessers (KMD) des LV in PAS-gefärbten Schnitten: **A:** Sham-operierte Tiere, Placebo-behandelt; **B:** TAC, Placebo-behandelt **C:** TAC, Sildenafil-behandelt. Vergrößerung des Objektivs 20fach. 1 cm in der Abbildung entspricht ca. 20µm. Die Vermessung der Querdurchmesser der Kardiomyozyten auf Höhe des Zellkerns ist hier exemplarisch für einige Zellen gezeigt. Die untere Abbildung zeigt den KMD des LV nach Transverser Aortenkonstriktion als Zeichen einer Hypertrophie der Kardiomyozyten signifikant vergrößert. Die Behandlung mit Sildenafil änderte den KMD nicht. N = 7 pro Gruppe, abgebildet ist jeweils der Mittelwert ± Standardfehler. * kennzeichnet einen p-Wert von ≤ 0,05.

Die morphometrischen Analysen zeigten eine signifikante Zunahme des KMD in den LV jener Tiere, an denen eine TAC vorgenommen wurde. Die Hypertrophie der linksventrikulären Kardiomyozyten nach TAC wurde durch Sildenafil nicht beeinflusst. Diese Resultate sind mit den Ergebnissen der Nekropsie und Echokardiographie kongruent.

3.2.3.2 Vermessung des Kollagenfasergehaltes als Maß für die kardiale Fibrosierung

Der Kollagenfasergehalt in Prozent der vermessenen Fläche als Maß für die Fibrose des linken Ventrikels lag in allen Gruppen unter 1 % (siehe Abb. 22). Im Kruskal-Wallis-Test wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen zu ermittelt. Die LV-Hypertrophie vier Wochen nach TAC wurde demnach nicht von einer interstitiellen Fibrose begleitet.

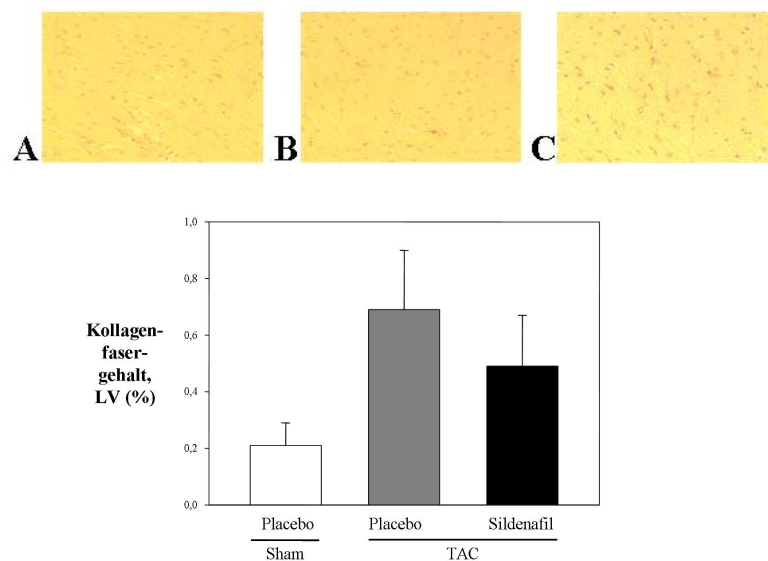


Abb. 22: Kollagenfasergehalt des linken Ventrikels (LV, in % der Fläche).

Die obere Abbildung A – C zeigt exemplarisch Abbildungen von Picro-Siriusrot gefärbten Schnitten des LV. **A:** Sham-operierte Tiere, Placebo-behandelt; **B:** TAC, Placebo-behandelt **C:** TAC, Sildenafil-behandelt. Der Kollagenfasergehalt war in den Gruppen, die eine Transverse Aortenkonstriktion (TAC) erhalten haben, tendenziell erhöht. Diese Ergebnisse sind jedoch nicht statistisch signifikant. N = 7 pro Gruppe, abgebildet ist jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler.

3.2.4 Western Blot-Analysen zum Nachweis von phosphorylierten Extrazellulär Regulierten Kinasen 1 und 2 als an myokardialem Zellwachstum beteiligte Signalproteine

Die Fraktion des phosphorylierten ERK 1 und 2 in Relation zum gesamten ERK 1 / 2-Gehalt des linksventrikulären Herzmuskels war in TAC-operierten Tieren signifikant erhöht. Dies zeugt von einer Aktivierung der MAPK-Kinase Signalwege, die zur Hypertrophie führen. Diese Aktivierung von ERK1 / 2 wurde durch Gabe von Sildenafil nicht beeinflusst (siehe Abb. 23).

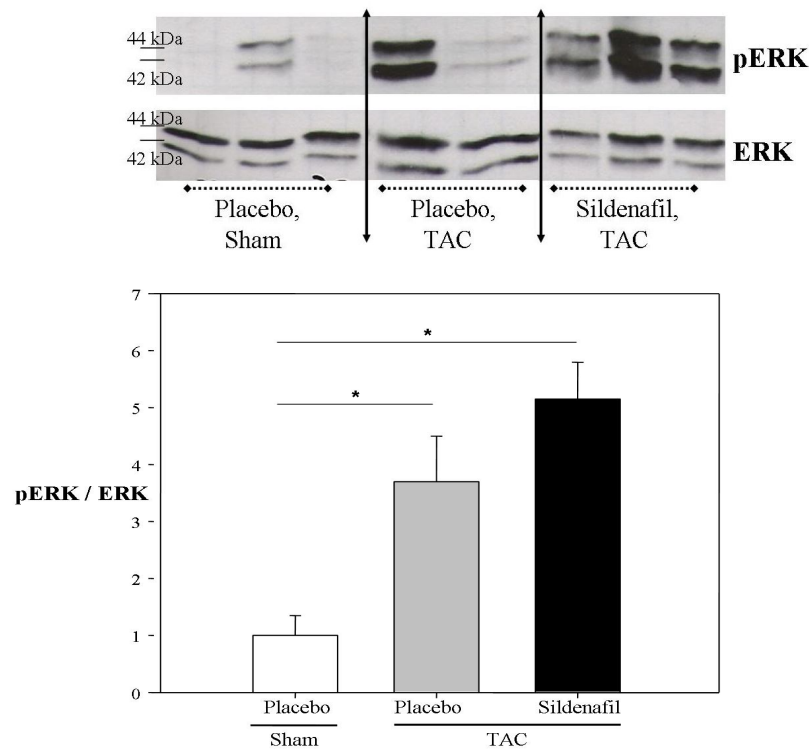


Abb. 23: Western Blot zum Nachweis von pERK und ERK in linksventrikulärem Gewebe.

Die Ratio von pERK zu ERK stieg in den Kollektiven, die eine Transverse Aortenkonstriktion (TAC) erhalten haben, signifikant an. Die Behandlung mit Sildenafil ergab keinen signifikanten Unterschied. Das Molekulargewicht von ERK 1 und 2 liegt bei 42 und 44 Kilo-Dalton (kDa). Oben sind exemplarisch Proben eines Original Western Blot der Studie abgebildet. N = 7 pro Gruppe, abgebildet ist jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler. * kennzeichnet einen p-Wert $\leq 0,05$. Die Mittelwerte wurden jeweils normiert auf die Gruppe, die eine Sham-Operation erhielt.

3.2.5 Western Blot-Analysen zum Nachweis von phosphoryliertem Troponin I als Zielprotein der Proteinkinase G I

Die quantitative Analyse von phosphoryliertem Tn I in Relation zum gesamten kardialen Tn I zeigte eine Erhöhung dieses Quotienten bei den operierten Tieren (siehe Abb. 24). Der Anstieg des phosphorylierten TnI in den operierten Gruppen lässt sich u. a. durch eine Stimulation von β -adrenergen Rezeptoren (Swiderek et al., 1990) als Folge der operativen Stenosierung und der damit zunehmenden Druck- sowie Stressbelastung des LV erklären. Diese Phosphorylierung wird durch Proteinkinase A vermittelt (Li et al., 2000) und dient der Verbesserung der Relaxation des Herzens und damit einer Verbesserung des Füllungszustandes bei Aktivierung des Sympathikus.

Die zusätzliche Erhöhung der phosphorylierten Fraktion durch Gabe von Sildenafil könnte indirekt Ausdruck einer cGMP-Erhöhung sein. Hier wurde zu der Fraktion, die bereits bei allen operierten Tieren durch PKA und PKG I phosphoryliert wurde, durch eine Erhöhung des intrazellulären cGMP zusätzlich die PKG I vermehrt aktiviert.

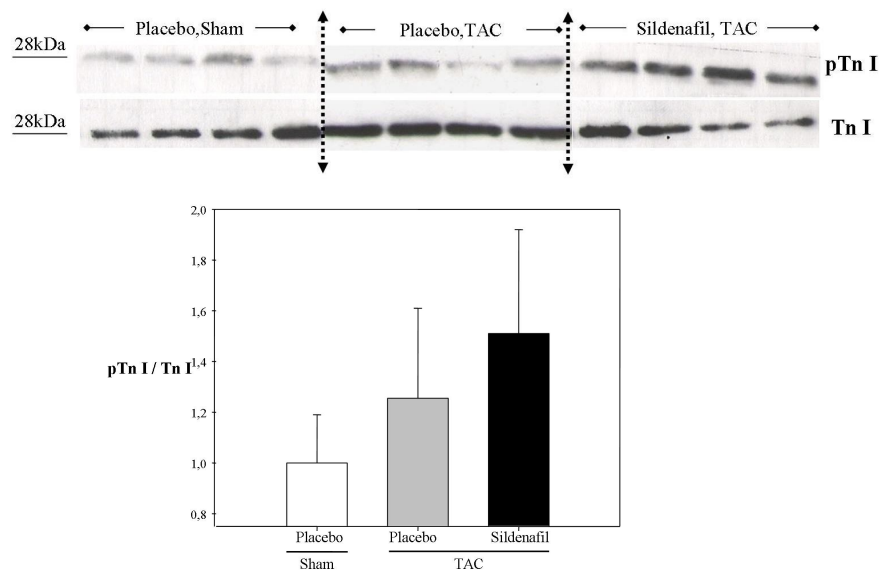


Abb. 24: Western Blot zum Nachweis von pTn I und Tn I in linksventrikulärem Gewebe.

Die Fraktion des phosphorylierten Tn I (pTn I) stieg nach Transverser Aortenkonstriktion (TAC) an. Die Therapie mit Sildenafil führte zu einer deutlichen Erhöhung des pTn I. Das Molekulargewicht von Tn I und pTn I liegt bei 28 Kilo-Dalton (kDa). Oben sind exemplarisch Proben eines Original Western Blot der Studie abgebildet. N = 7 pro Gruppe, abgebildet ist jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler. Die Mittelwerte wurden jeweils normiert auf die Gruppe, die eine Sham-Operation erhielt.

3.2.6 Messung des zyklischen Guanosinmonophosphat-Gehaltes im Gewebe

3.2.6.1 Messung des zyklischen Guanosinmonophosphat-Gehaltes in linksventrikulärem Gewebe

Der RIA zeigt, dass der cGMP-Gehalt in den operierten Gruppen signifikant stieg, während die Differenz zwischen der behandelten und unbehandelten Gruppe nicht signifikant war (siehe Abb. 25). Gut sichtbar waren allerdings die Effekte der Aortenkonstriktion und der daraus resultierenden Stressbelastung auf das Herz. Die cGMP-Synthese wird möglicherweise durch höhere zirkulierende und lokal wirksame Mengen an ANP und BNP gesteigert (Burnett et al., 1986; Mukoyama et al., 1990).

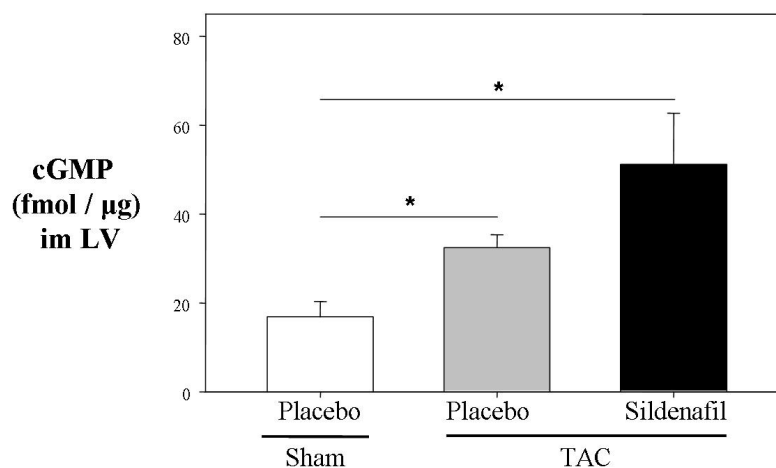


Abb. 25: Im Radioimmunoassay gemessener cGMP-Gehalt (gemessen in fmol pro µg Protein) des linken Ventrikels.

In den Kollektiven mit operativer Stenosierung der Aorta (TAC) war der cGMP-Gehalt im linken Ventrikel (LV) signifikant erhöht. Unter Sildenafil-Behandlung stieg der cGMP-Gehalt im LV weiter an, aufgrund der großen Streuung war dieser Effekt nicht statistisch signifikant. N = 7 pro Gruppe, abgebildet ist jeweils der Mittelwert ± Standardfehler. * kennzeichnet einen p-Wert ≤ 0,05.

3.2.6.2 Messung des zyklischen Guanosinmonophosphat-Gehaltes in pulmonalem Gewebe

Die TAC führte auch im Lungengewebe zu einem leichten Anstieg des cGMP-Gehaltes. Dieser ist in Placebo-behandelten Tieren durch einen Anstieg des zirkulierenden ANP, hervorgerufen durch den mechanischen Stress nach TAC, zu erklären. Der weitaus höhere Anstieg des cGMP-Gehaltes in den Sildenafil-behandelten Tieren spricht für die erfolgreiche Aufnahme des Pharmakons und effiziente Hemmung der PDE 5 in der Lunge (siehe Abb. 26).

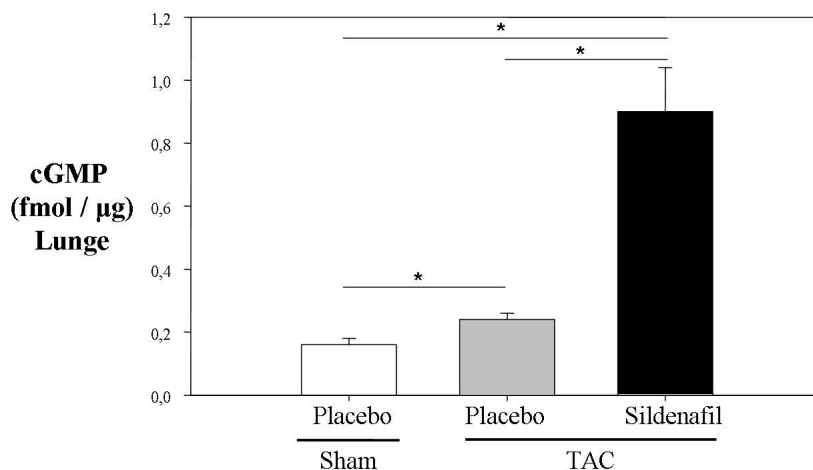


Abb. 26: Im Radioimmunoassay gemessener cGMP-Gehalt (gemessen in fmol pro µg Protein) der Lunge.

Der cGMP-Gehalt stieg nach Transverser Aortenkonstriktion (TAC) signifikant an. Hier zeigten sich zudem statistisch signifikante Unterschiede durch Behandlung mit Sildenafil. N = 7 pro Gruppe, abgebildet ist jeweils der Mittelwert ± Standardfehler. * kennzeichnet einen p-Wert $\leq 0,05$.

3.3 Studie 2: Kardiovaskuläre Effekte von Sildenafil bei Mäusen mit globaler Deletion des Guanylylzyklase-A Rezeptors

3.3.1 Blutdruckmessungen und Nekropsiedaten

Die plethysmographische Messung des Blutdrucks in der Schwanzarterie dient der Darstellung Genotyp-abhängiger Unterschiede und der Beurteilung systemischer, insbesondere vaskulärer Effekte des Sildenafil. Mäuse mit globaler Deletion des GC-A Rezeptors zeigen eine ausgeprägte arterielle Hypertonie (Lopez et al., 1995). Die systolischen Blutdruckwerte von GC-A defizienten Tieren lagen mit 135 ± 3 mmHg statistisch signifikant über den Werten der Mäuse mit intakter GC-A Expression mit 114 ± 2 mmHg. Die vierwöchige orale Behandlung mit Sildenafil führte zu einem signifikanten Rückgang des Systolischen Blutdruckes in den GC-A $-/-$ Tieren. Eine Übersicht über die Entwicklung des systolischen Blutdruckes bietet Abbildung 27.

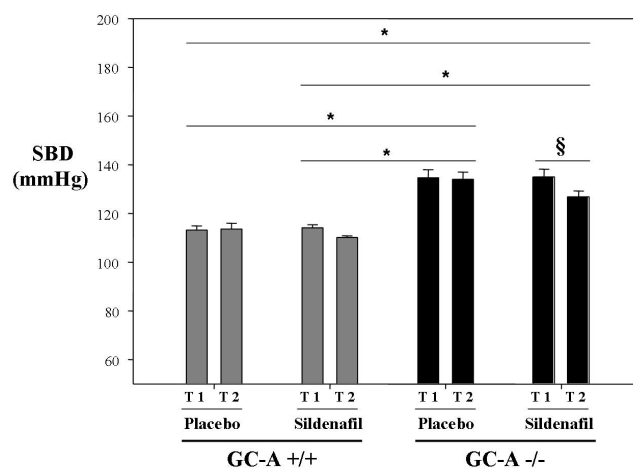


Abb. 27: Plethysmographische Messung des Systolischen Blutdruckes (SBD, in mmHg).

Hier werden die Blutdruckwerte, die vor Behandlung und nach Ende der Behandlung (mit Placebo oder Sildenafil) gemessenen wurden, dargestellt. $N = 5$ (GC-A +/+), bzw. $N = 8$ (GC-A -/-) pro Gruppe, abgebildet ist jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler. Vor und nach Behandlung bestanden signifikante Unterschiede (*) zwischen den systolischen Blutdrücken der GC-A +/+ und GC-A -/- Tiere gemäß dem Phänotyp der Tiere. Die Behandlung mit Sildenafil senkte den systolischen Blutdruck der GC-A -/- Tiere signifikant (§), sorgte jedoch nicht für einen kompletten Rückgang des arteriellen Hypertonus.

Wie die Abbildungen 28 bis 30 sowie Tabelle 5 zeigen, haben GC-A $-/-$ Mäuse deutlich vergrößerte Herzen mit einer starken Zunahme der Verhältnisse des Herzgewichtes sowie links- und rechtsventrikulären Gewichtes zur Tibiallänge. Dieser Phänotyp mit ausgeprägter Links- und Rechtsherzhypertrophie wurde zuvor bereits in der Literatur beschrieben (Holtwick et al., 2002; Lopez et al., 1995). In den Sildenafil-behandelten GC-A $-/-$ Tieren blieben trotz einer signifikanten Senkung des systolischen Blutdruckes die Ratios des Herz-, links- und rechtsventrikulären Gewichtes zum Körpergewicht oder zur Tibiallänge (siehe Abb. 28-30) weiterhin signifikant gegenüber GC-A $+/+$ Tieren erhöht.

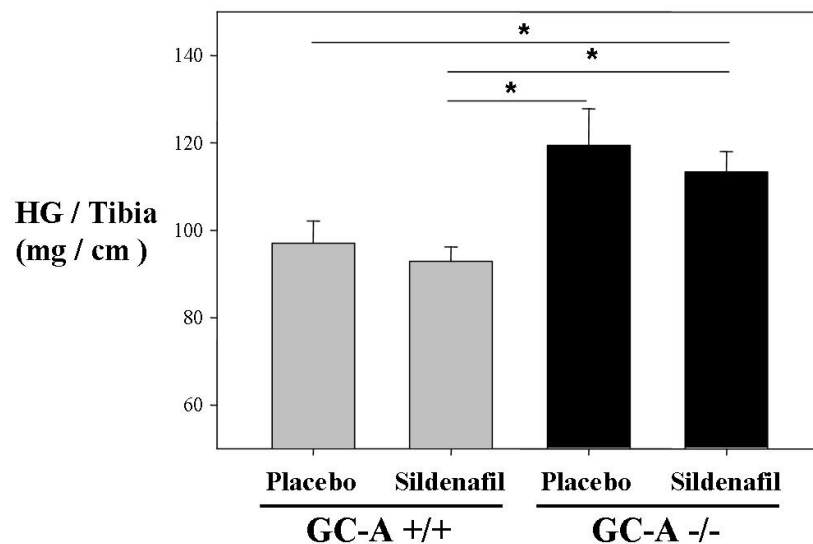


Abb. 28: Herzgewicht (HG, in mg) bezogen auf die Tibiallänge (in cm).

Das Herzgewicht ist im GC-A $-/-$ Kollektiv signifikant erhöht. Eine Behandlung mit Sildenafil führt zu keiner signifikanten Abnahme des Herzgewichtes. N = 5 (GC-A $+/+$), bzw. N = 8 (GC-A $-/-$) pro Gruppe, abgebildet ist jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler. * kennzeichnet einen p-Wert von $\leq 0,05$.

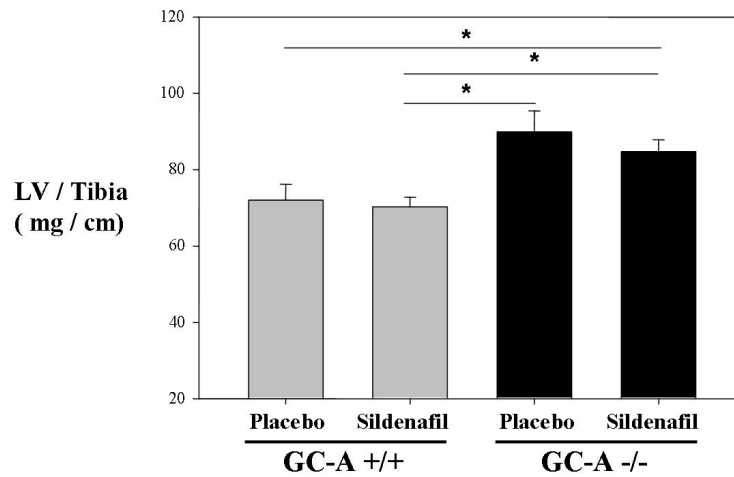


Abb. 29: Gewicht des linken Ventrikels (LV, in mg) bezogen auf die Tibialänge (in cm). Hier bestanden ebenfalls nur signifikante Differenzen zwischen den Genotypen der Tiere. Die Behandlung mit Sildenafil beeinflusste das Gewicht des linken Ventrikels nicht. N = 5 (GC-A +/+), bzw. N = 8 (GC-A -/-) pro Gruppe, abgebildet ist jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler. * kennzeichnet einen p-Wert von $\leq 0,05$.

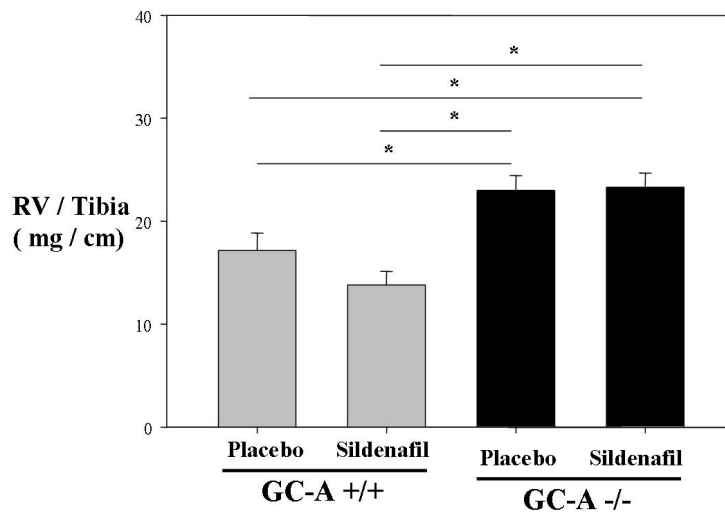


Abb. 30: Gewicht des rechten Ventrikels (RV, in mg) bezogen auf die Tibialänge (in cm). Auch hier bestanden signifikante Differenzen nur zwischen den Genotypen. Die Behandlung mit Sildenafil beeinflusste das Gewicht des rechten Ventrikels nicht. N = 5 (GC-A +/+), bzw. N = 8 (GC-A -/-) pro Gruppe, abgebildet ist jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler. * kennzeichnet einen p-Wert von $\leq 0,05$.

Tabelle 5: Bei Nekropsie und Blutdruckmessung gewonnenen Daten.

KGW = Körpergewicht, SBD = systolischer Blutdruck, DBD = diastolischer Blutdruck, T1 = vor Behandlung, T2 = zu Ende der Behandlung, MW = Mittelwert, SEM = Standardfehler. (*) kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zwischen GC-A +/+ und GC-A -/- Tieren, (#) steht für signifikante Unterschiede durch Behandlung mit Sildenafil (im Vergleich zur Bezugsgruppe), sowie eine signifikante Veränderung des Parameters über die Zeit.

	GC-A +/+		GC-A -/-	
	Placebo	Sildenafil	Placebo	Sildenafil
	MW ± SEM	MW ± SEM	MW ± SEM	MW ± SEM
KGW (g)	31 ± 1	32 ± 2	30 ± 1	29 ± 1
Tibiallänge (cm)	1,61 ± 0,08	1,73 ± 0,04	1,72 ± 0,02	1,73 ± 0,02
Herzgewicht [HG] (mg)	155 ± 3	161 ± 7	206 ± 14*	196 ± 7*
LV-Gewicht (mg)	115 ± 3	121 ± 5	155 ± 9*	147 ± 5*
RV-Gewicht (mg)	27 ± 2	24 ± 2	40 ± 2*	40 ± 2*
Lungenfeuchtgewicht (mg)	138 ± 4	140 ± 7	170 ± 8*	163 ± 6*
SBD T1 (mmHg)	113 ± 2	114 ± 1	135 ± 3*	135 ± 3*
SBD T2 (mmHg)	114 ± 2	110 ± 1	134 ± 3*	127 ± 2*#
DBD T1 (mmHg)	72 ± 3	66 ± 3	78 ± 4	74 ± 4
DBD T2 (mmHg)	74 ± 2	55 ± 1##	69 ± 3	72 ± 6
HG / Tibia (mg / cm)	97 ± 5	93 ± 3	119 ± 8*	113 ± 5*
HG / KGW (x 10⁻³)	5 ± 0,1	5 ± 0,1	7 ± 0,3*	7 ± 0,3*
LV / Tibia (mg / cm)	72 ± 4	70 ± 3	90 ± 5*	85 ± 3*
LV / KGW (x 10⁻³)	4 ± 0,1	4 ± 0,1	5 ± 0,2*	5 ± 0,1*
RV / Tibia (mg / cm)	17 ± 2	14 ± 1	23 ± 1*	23 ± 1*
RV / KGW (x 10⁻³)	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1	1,34 ± 0,1*	1,38 ± 0,1*
Lunge / Tibia (mg / cm)	86 ± 6	81 ± 4	99 ± 4*	94 ± 3*
Lunge / KGW (x 10⁻³)	4 ± 0,2	4 ± 0,3	6 ± 0,3*	6 ± 0,1*

3.3.2 Echokardiographie

Die echokardiographischen Untersuchungen belegen zunächst die phänotypischen Charakteristika der GC-A $-/-$ Tiere (siehe Tabelle 6). So zeigte sich beim Vergleich der LV-Hinterwandstärke eine signifikante Verdickung der Hinterwand im GC-A $-/-$ Kollektiv gegenüber dem Wildtyp. Auch die fraktionelle Verkürzung der Ventrikelwand war für GC-A $-/-$ -Tiere gegenüber GC-A $+/+$ Tieren erhöht (siehe Abb. 31). Dieser Effekt könnte auf dem Frank-Starling-Mechanismus beruhen, der bei erhöhter Druckbelastung - begründet durch die im GC-A $-/-$ Genotyp erhöhte Nachlast - zur verstärkten Verkürzung der Sarkomere und einer damit erhöhten Auswurfleistung führt. Dies spiegelt sich auch wieder in einer erhöhten Ejektionsfraktion und einem ebenfalls erhöhten Schlagvolumen, verglichen mit GC-A $+/+$ Mäusen (siehe Abb. 32). Insgesamt sind dies Charakteristika einer funktionell gut kompensierten, adaptiven Herzhypertrophie bei GC-A $-/-$ Mäusen.

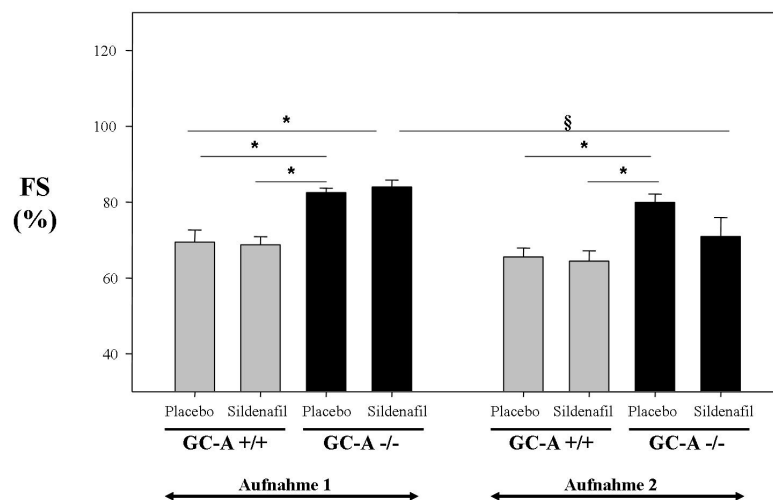


Abb. 31: Fraktionelle Verkürzung (FS) der Wand des linken Ventrikels, 2D-Mode. Aufnahme 1 wurde vor Behandlung der Gruppen gefertigt, hier sah man eine deutliche Erhöhung der FS im GC-A $-/-$ Kollektiv. Aufnahme 2 wurde vor Beenden der Behandlung gefertigt. Hier wurde eine Abnahme der FS in Sildenafil behandelten GC-A $-/-$ Mäusen deutlich. N = 5 (GC-A $+/+$), bzw. N = 8 (GC-A $-/-$) pro Gruppe, abgebildet ist jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler. § kennzeichnet eine im Wilcoxon-Rangtest ermittelte signifikante Differenz zwischen den Aufnahmezeitpunkten, * kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen GC-A $+/+$ und GC-A $-/-$ Tieren.

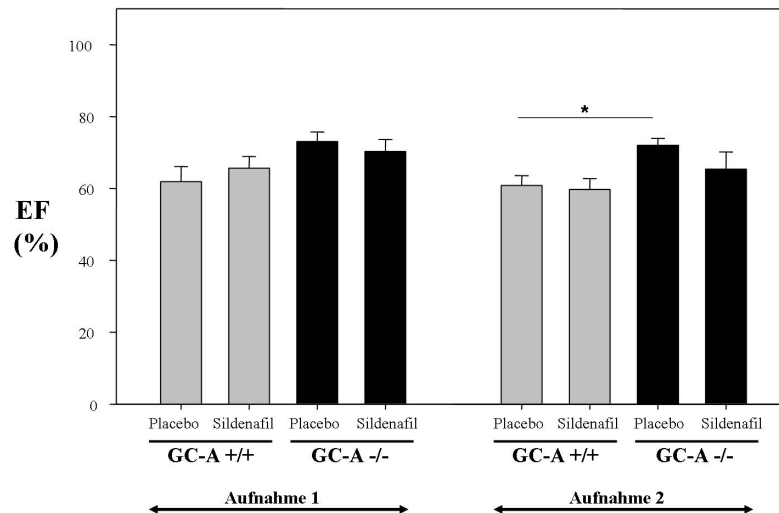


Abb. 32: Ejektionsfraktion (EF) des linken Ventrikels.

Die Ejektionsfraktion wurde nach Teichholz berechnet. Sie korreliert mit der FS des LV. Daher waren zum Aufnahmezeitpunkt 1 erhöhte Ejektionsfraktionen in den GC-A defizienten Tieren festzustellen. Die EF ging ebenso wie die FS in Sildenafil-behandelten GC-A -/-Tieren nach Behandlung mit Sildenafil (Aufnahme 2) zurück. N = 5 (GC-A +/+), bzw. N = 8 (GC-A -/-) pro Gruppe, abgebildet ist jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler. * kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen GC-A +/+ und GC-A -/- Tieren.

Nach neunwöchiger Behandlung wird ersichtlich, dass die Gabe von Sildenafil im GC-A +/+ Kollektiv keine signifikanten Veränderungen der Parameter hervorruft. Die Rangvarianzanalyse nach Friedman ergibt keine signifikante Veränderung der Parameter über den Behandlungszeitraum.

Bei Betrachtung des FS im 2D-Mode zeigt die unbehandelte GC-A -/- Gruppe eine signifikante Erhöhung im Vergleich zum Wildtyp-Kollektiv. Unter Sildenafil fielen EF und FS gegenüber dem Zeitpunkt vor Behandlung deutlich ab, die Abnahme der FS ist signifikant.

Wie in Abbildung 33 ersichtlich, nahm die Hinterwand des linken Ventrikels über den Behandlungszeitraum weiterhin zu. Es bestehen wie vor Beginn der Studie Unterschiede zwischen GC-A -/- und GC-A +/+ Tieren. Allerdings nahm die Hinterwandstärke der mit Sildenafil behandelten GC-A -/- Tiere in der Systole nicht in gleichem Maße wie die der unbehandelten Gruppe zu. In Kontext mit den anderen

funktionellen Parametern gebracht, bedeutet dies einen Verlust der Kontraktionskraft des Herzens nach einer Behandlung mit Sildenafil in der GC-A $-/-$ Gruppe. Nennenswerte Veränderungen der IVSS und IVSD traten in den Gruppen nicht auf.

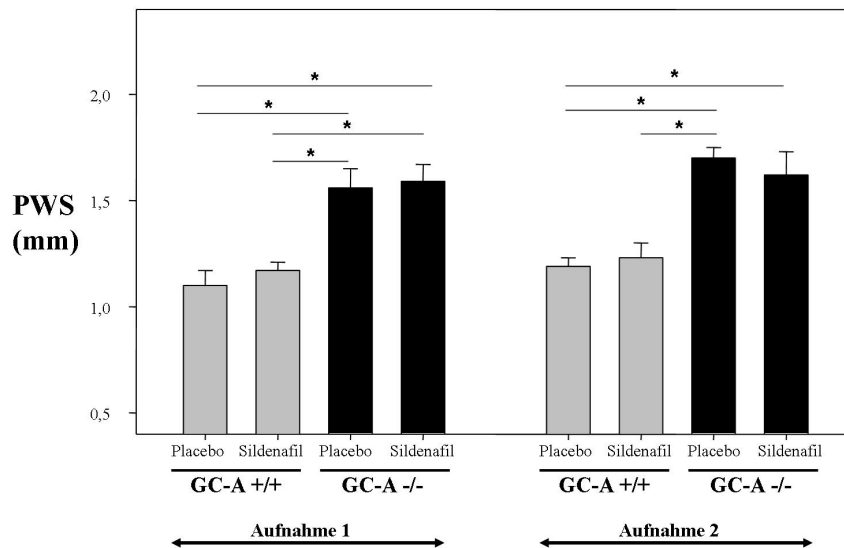


Abb. 33: Echokardiographische Vermessung der Hinterwand des linken Ventrikels in der Systole (PWS, in mm) im Studienverlauf.

Vor Behandlungsbeginn bestehen signifikante Unterschiede zwischen den Hinterwänden der GC-A defizienten Tiere im Vergleich zu den GC-A $+/+$. N = 5 (GC-A $+/+$), bzw. N = 8 (GC-A $-/-$) pro Gruppe, abgebildet ist jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler. * kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen GC-A $+/+$ und GC-A $-/-$ Tieren.

Bei Betrachtung von Abbildung 34 fällt auf, dass ESD und EDD in den Sildenafil behandelten GC-A $-/-$ Tieren signifikant zunehmen. Auch das EDV und ESV nahmen zum Zeitpunkt 2 signifikant zu. Dies lässt auf eine Dilatation des Ventrikels über den Behandlungszeitraum schließen. Dabei gilt zu beachten, dass das SV und die EF konstant blieben, d. h. dass keine Dekompensation des kardiovaskulären Systems vorliegt. Die Berechnung der Masse nach Teichholz zeigte nach dem Behandlungsintervall signifikante Unterschiede zwischen den Mausstämmen, für die GC-A defizienten Tiere war eine Zunahme der Masse über die Behandlungsdauer signifikant.

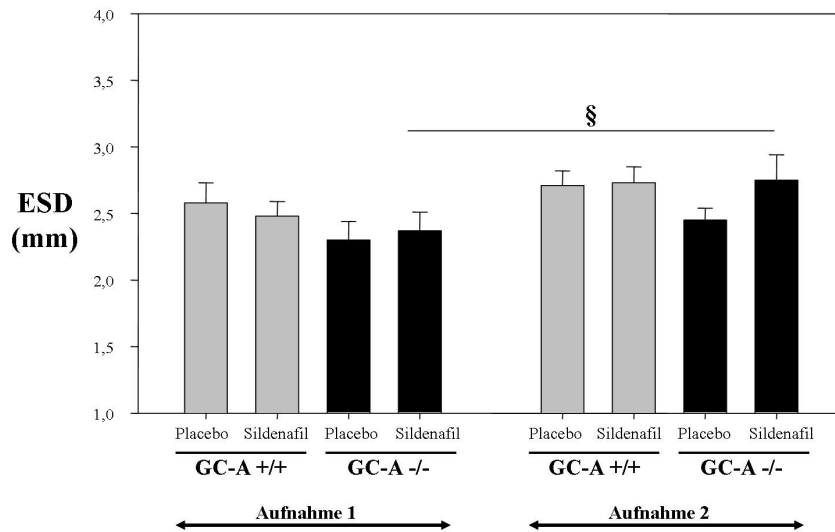


Abb. 34: Echokardiographische Vermessung des endsystolischen Diameters des linken Ventrikels (ESD, in mm) im Studienverlauf.

Während zu Beginn der Studie kaum Unterschiede zwischen den Kollektiven bestanden, fällt die signifikante Zunahme des ESD und - hier nicht abgebildet - EDD über den Behandlungsverlauf in Gruppe D auf. N = 5 (GC-A +/+), bzw. N = 8 (GC-A -/-) pro Gruppe, abgebildet ist jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler. (§) kennzeichnet eine signifikante Veränderung des Parameters über den Behandlungszeitraum.

Nach achtwöchigem Studienintervall zeichnet sich eine funktionell gut kompensierte Linksherzhypertrophie der GC-A defizienten Tiere ab, wie zuvor beschrieben. Eine Behandlung mit Sildenafil verbessert die kardiale Funktion nicht. Tendenziell wird - in Anbetracht des bestehenden arteriellen Hypertonus – die linksventrikuläre Funktion sogar verschlechtert. Die Parameter, die in der Bildgebung als Korrelat des Kardiomyozytenwachstums auf histologischer Ebene gewertet werden können, verändern sich unter Behandlung mit Sildenafil nicht.

Tabelle 6: Echokardiographisch vermessene und berechnete Parameter.

EF, EDV, ESV und Masse wurden nach Teichholz berechnet. 2D FS: Die fraktionelle Verkürzung der Ventrikelwand wurde im 2D-Mode berechnet, alle anderen Parameter im M-Mode. (*) kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen GC-A ++ und GC-A -/- Tieren, (§) kennzeichnet eine signifikante Veränderung des Parameters über den Studienzeitraum.

	Aufnahme 1				Aufnahme 2			
	GC-A ++		GC A -/-		GC-A ++		GC A -/-	
	<u>Placebo</u>	<u>Sildenafil</u>	<u>Placebo</u>	<u>Sildenafil</u>	<u>Placebo</u>	<u>Sildenafil</u>	<u>Placebo</u>	<u>Sildenafil</u>
	MW ± SEM	MW ± SEM	MW ± SEM	MW ± SEM	MW ± SEM	MW ± SEM	MW ± SEM	MW ± SEM
2D FS (%)	69,43 ± 3,24	68,78 ± 2,11	82,51 ± 1,18*	83,98 ± 1,86*	65,55 ± 2,37	64,43 ± 2,74	79,95 ± 2,20*	70,93 ± 5,04§
IVS D (mm)	1,07 ± 0,05	1,14 ± 0,14	1,05 ± 0,07	1,04 ± 0,08	1,02 ± 0,10	0,93 ± 0,07	1,13 ± 0,04	1,04 ± 0,03
EDD (mm)	3,86 ± 0,10	3,85 ± 0,10	3,96 ± 0,12	3,93 ± 0,14	4,00 ± 0,05	3,99 ± 0,11	4,18 ± 0,14	4,34 ± 0,08§
PWD (mm)	0,79 ± 0,05	0,79 ± 0,04	0,99 ± 0,04*	0,98 ± 0,04*	0,79 ± 0,01	0,83 ± 0,05	1,04 ± 0,03*	1,08 ± 0,08*
IVS S (mm)	1,52 ± 0,07	1,58 ± 0,19	1,73 ± 0,11	1,60 ± 0,11	1,41 ± 0,11	1,41 ± 0,04	1,80 ± 0,07*	1,65 ± 0,10*
ESD (mm)	2,58 ± 0,15	2,48 ± 0,11	2,30 ± 0,14	2,37 ± 0,14	2,71 ± 0,11	2,73 ± 0,12	2,45 ± 0,09	2,75 ± 0,19§
PW S (mm)	1,10 ± 0,07	1,17 ± 0,04	1,56 ± 0,09*	1,59 ± 0,08*	1,19 ± 0,04	1,23 ± 0,07	1,70 ± 0,05*	1,62 ± 0,11*§
EDV (mm³)	64,56 ± 3,93	64,07 ± 4,15	69,15 ± 4,79	67,84 ± 5,93	70,07 ± 2,20	69,76 ± 4,37	78,45 ± 6,29	85,10 ± 3,82§
ESV (mm³)	24,66 ± 3,21	22,45 ± 3,42	19,00 ± 2,64	20,32 ± 3,18	27,63 ± 2,67	28,19 ± 2,76	21,71 ± 2,13	29,91 ± 4,46§
SV (ml)	0,04 ± 0,003	0,04 ± 0,002	0,05 ± 0,003	0,05 ± 0,006	0,04 ± 0,001	0,04 ± 0,003	0,06 ± 0,005	0,06 ± 0,004
HZV (ml/min)	21,87 ± 1,99	23,61 ± 1,44	27,39 ± 2,14	26,06 ± 2,17	24,35 ± 0,79	25,25 ± 2,26	32,06 ± 3,51	29,57 ± 2,48
EF (%)	61,90 ± 4,23	65,66 ± 3,24	73,05 ± 2,70	70,30 ± 3,35	60,81 ± 2,78	59,72 ± 3,03	71,97 ± 1,96*	65,38 ± 4,78
Masse (mg)	197,47 ± 12,03	202,34 ± 6,41	229,32 ± 13,68	222,28 ± 14,03	206,57 ± 6,62	199,30 ± 10,12	270,86 ± 16,87*	285,57 ± 21,19*§

3.3.3 Histologische Analysen

3.3.3.1 Vermessung des Kardiomyozytendurchmessers als morphologisches Korrelat der Herzhypertrophie

Die Vermessung der Kardiomyozytendiameter zeigte lediglich eine signifikante Steigerung des Durchmessers in den mit Placebo behandelten GC-A $-/-$ Tieren verglichen mit GC-A $+/+$ Tieren (siehe Abb. 35). Die signifikante Zunahme des Zelldurchmessers in Sildenafil-behandelten GC-A $-/-$ Tieren, verglichen mit den GC-A $+/+$ Gruppen, wie sie sich in der Echokardiographie beispielsweise an der Zunahme der linksventrikulären Masse darstellte, war auf histologischer Ebene nicht zu sehen.

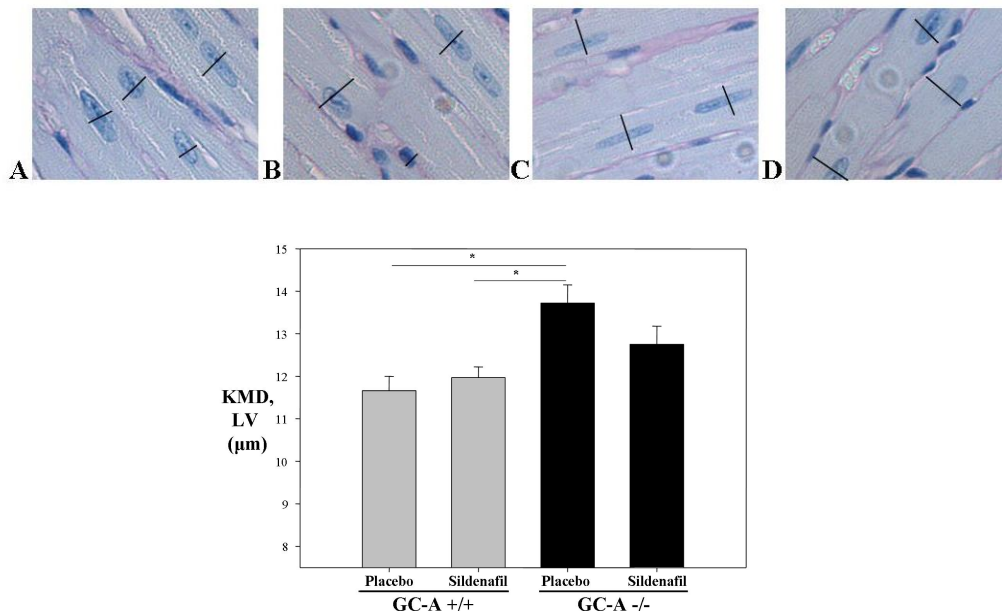


Abb. 35: Kardiomyozytendurchmesser (KMD) des LV (μm).

Die obere Abbildung (A-D) zeigt exemplarisch die Vermessung des Kardiomyozytendurchmessers des LV in PAS-gefärbten Schnitten: **A:** GC-A $+/+$, Placebo; **B:** GC-A $+/+$, Sildenafil; **C:** GC-A $-/-$, Placebo; **D:** GC-A $-/-$, Sildenafil. Vergrößerung des Objektivs: 20fach. 1cm in der Abbildung entspricht ca 20 μm . Die Vermessung der Querdurchmesser der Kardiomyozyten auf Höhe des Zellkerns ist hier exemplarisch für einige Zellen gezeigt. Der KMD war nur in den mit Placebo behandelten GC-A $-/-$ Tieren signifikant erhöht. N = 5 (GC-A $+/+$), bzw. N = 8 (GC-A $-/-$) pro Gruppe, abgebildet ist jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler. Mit * gekennzeichnet sind statistisch relevante Unterschiede zwischen GC-A $+/+$ und GC-A $-/-$ Tieren.

Abweichend von den zuvor gewonnenen Ergebnissen aus Echokardiographie und Nekropsie bestand hier also die durch den GC-A $-/-$ Genotyp bedingte Hypertrophie der Kardiomyozyten unter Sildenafilbehandlung nicht weiter.

Die Vermessung des Kardiomyozytendurchmessers der rechten Ventrikel zeigte erstaunlicherweise keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Gruppen, es ließen sich auch keine Unterschiede zwischen GC-A $+/+$ und GC-A $-/-$ Tieren feststellen (siehe Abb. 36). Unterschiede zwischen diesen zwei Gruppen wären aufgrund der Messungen des rechtsventrikulären Gewichtes, sowie des Verhältnisses von rechtsventrikulärem Gewicht und Tibiallänge eigentlich zu erwarten, zumal eine Pulmonale Arterielle Hypertonie zu den phänotypischen Charakteristika des GC-A defizienten Kollektivs zählt (Lopez et al., 1995).

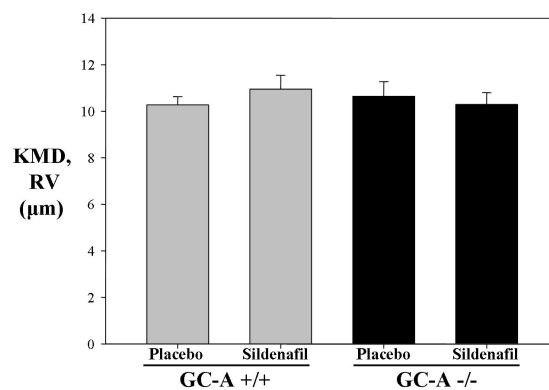


Abb. 36: Kardiomyozytendurchmesser (KMD) des rechten Ventrikels (RV, in µm).

Der KMD war für die Myozyten des rechten Ventrikels annähernd identisch in allen vier Gruppen. N = 5 (GC-A $+/+$), bzw. N = 8 (GC-A $-/-$) pro Gruppe, abgebildet ist jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler.

3.3.3.2 Vermessung des Kollagenfasergehaltes als Maß für die kardiale Fibrosierung

Der Kollagenfasergehalt des linken Ventrikels nahm im GC-A $-/-$ Kollektiv gegenüber dem GC-A $+/+$ Kollektiv signifikant zu, allerdings konnten keine signifikanten Differenzen zwischen behandelten und unbehandelten Tieren ermittelt werden (siehe

Abb. 37). Dies lässt sich anhand der für den GC-A $-/-$ Phänotyp spezifischen Herzhypertrophie und arteriellen Hypertonie erklären. Im Rahmen dieser phänotypischen Veränderungen kam es unter anderem zur interstitiellen Fibrose des Herzens, die hier an einem gesteigerten Kollagenfasergehalt des Herzgewebes ersichtlich wird.

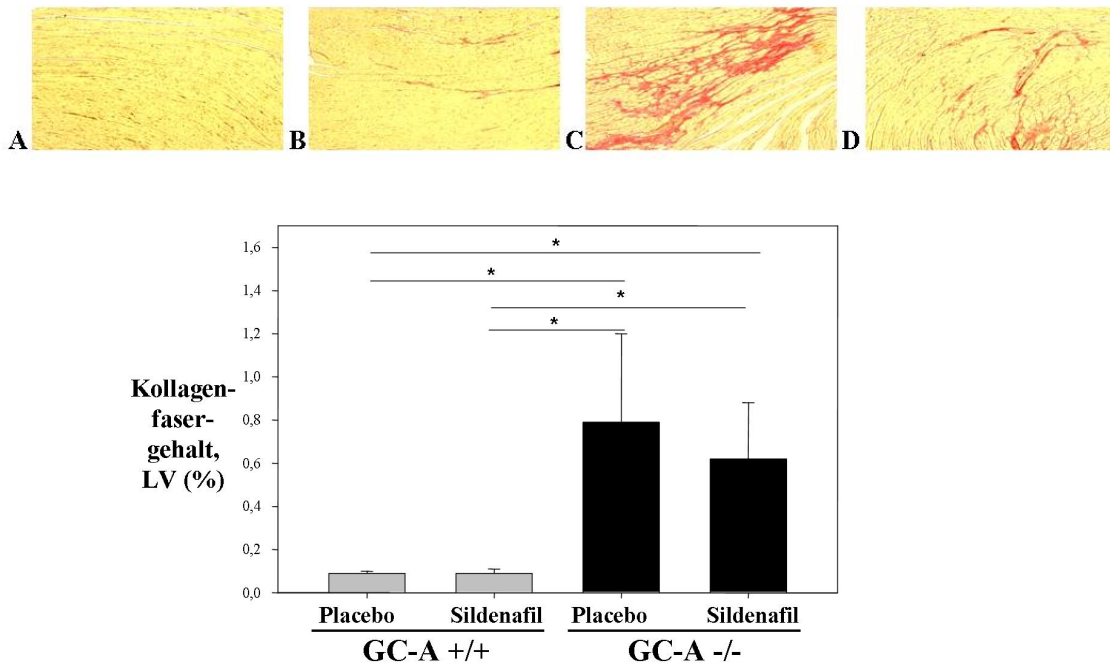


Abb. 37: Kollagenfasergehalt des linken Ventrikels (in % der Fläche). Die obere Abbildung **A-D** zeigt exemplarisch Abbildungen von Picro-Siriusrot gefärbten Schnitten des LV: **A:** GC-A $+/+$, Placebo; **B:** GC-A $+/+$, Sildenafil; **C:** GC-A $-/-$, Placebo; **D:** GC-A $-/-$, Sildenafil. Der Kollagenfasergehalt des linken Ventrikels (LV) nahm in den GC-A defizienten Tieren zu, wobei eine Behandlung mit Sildenafil keine signifikanten Veränderungen hervorruft. N = 5 (GC-A $+/+$), bzw. N = 8 (GC-A $-/-$) pro Gruppe, abgebildet ist jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler.* kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen.

3.3.4 Western Blot-Analysen zum Nachweis von phosphorylierten Extrazellulär Regulierten Kinasen 1 und 2 als an myokardialem Zellwachstum beteiligte Signalproteine

Die densitometrische Analyse des phosphorylierten ERK 1 und 2 bezogen auf den Gesamtgehalt an ERK 1 / 2 zeigt, dass die Fraktion der phosphorylierten ERK in Placebo-behandelten GC-A $+/+$ Tieren am höchsten ist. Statistisch signifikante Unterschiede waren aufgrund der großen Streuung zwischen den Gruppen nicht auszumachen (siehe Abb. 38).

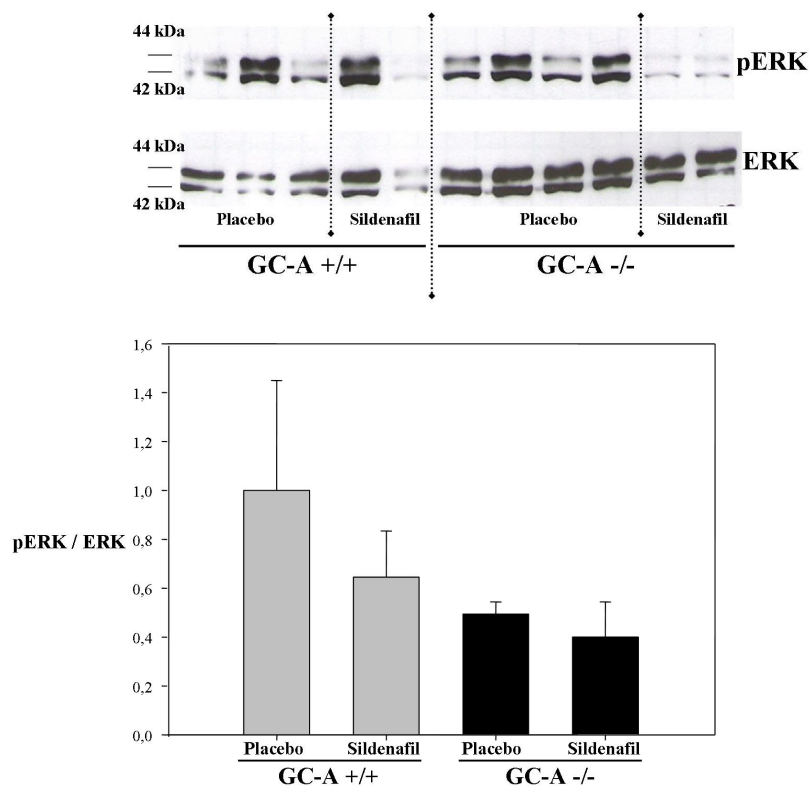


Abb. 38: Western Blot zum Nachweis von pERK und ERK in linksventrikulärem Gewebe. Der prozentuale Anteil des phosphorylierten ERK (pERK) ist im GC-A-defizienten Kollektiv deutlich verringert. Das Molekulargewicht von ERK 1 und 2 liegt bei 42 und 44 Kilo-Dalton (kDa). Oben sind exemplarisch Proben eines Original Western Blot der Studie abgebildet. N = 5 (GC-A $+/+$), bzw. N = 8 (GC-A $-/-$) pro Gruppe, abgebildet ist jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler. Die Mittelwerte wurden jeweils normiert auf die GC-A $+/+$, Placebo- Gruppe.

3.3.5 Western Blot-Analysen zum Nachweis von phosphoryliertem Troponin I als Zielprotein der Proteinkinase G I

Die phosphorylierte Fraktion des kardialen Tn I ist - normalisiert auf das gesamte kardiale Tn I - in den GC-A^{-/-} Tieren leicht reduziert (siehe Abb. 39). Aufgrund der großen Streuung ist dieses Ergebnis jedoch nicht signifikant. Dies lässt sich durch eine verminderte Produktion von cGMP über die partikuläre GC und eine dadurch verminderte PKG-induzierte Phosphorylierung von Tn I am Seronin 23 / 24-Rest erklären (Layland et al., 2005). Die Gabe von Sildenafil kann die phosphorylierte Fraktion des Tn I nicht steigern. Eine Phosphorylierung von Tn I kann zudem in allen Tieren über cAMP-abhängige PKA Aktivierung erfolgen.

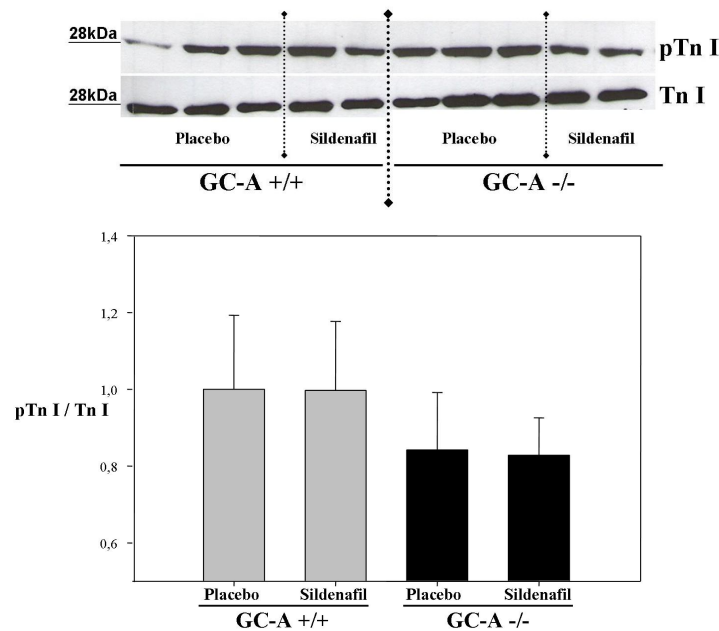


Abb. 39: Western Blot zum Nachweis von pTn I und Tn I in linksventrikulärem Gewebe.

Die Verminderung der phosphorylierten Fraktion des Tn I ist durch eine im GC-A^{-/-} Kollektiv verminderte cGMP Synthese zu begründen. Hier erfolgt die Aktivierung von PKG I einzig durch cGMP, das über NO und die lösliche GC synthetisiert wurde. Eine Behandlung mit Sildenafil führt zu keinem Anstieg der phosphorylierten Fraktion des Tn I. Das Molekulargewicht von Tn I liegt bei 28 Kilo-Dalton (kDa). Oben sind exemplarisch Proben eines Original Western Blot der Studie abgebildet. N = 5 (GC-A^{+/+}), bzw. N = 8 (GC-A^{-/-}) pro Gruppe, abgebildet ist jeweils der Mittelwert ± Standardfehler. Die Mittelwerte wurden jeweils normiert auf die GC- A^{+/+}, Placebo- Gruppe.

3.3.6 Messung des zyklischen Guanosinmonophosphat-Gehaltes im Gewebe

3.3.6.1 Messung des zyklischen Guanosinmonophosphat-Gehaltes in linksventrikulärem Gewebe

Der im RIA gemessene linksventrikuläre cGMP-Gehalt der Herzen ist signifikant geringer im GC-A $-/-$ -Kollektiv (siehe Abb. 40). Hier wird ausschließlich über eNOS und sGC cGMP produziert. In beiden mit Sildenafil behandelten Gruppen steigt der cGMP-Gehalt gegenüber der unbehandelten Gruppe an, allerdings nicht signifikant.

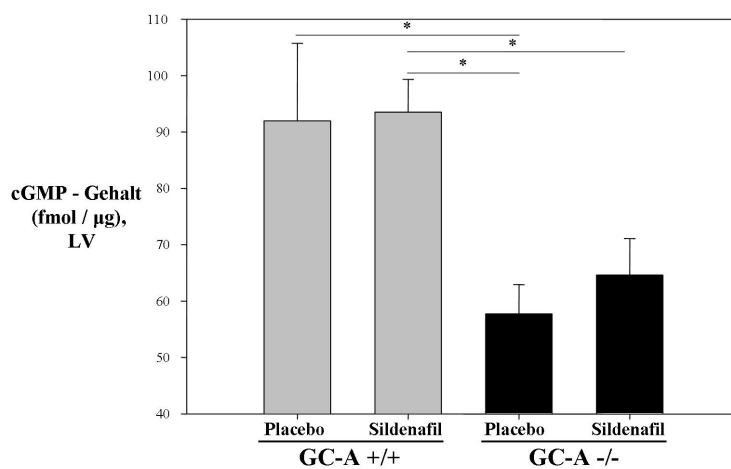


Abb. 40: Im Radioimmunoassay gemessener cGMP-Gehalt (gemessen in fmol pro μ g Protein) des linken Ventrikels.

Der cGMP-Gehalt war in Herzen der GC-A $-/-$ Tiere signifikant erniedrigt, da kein cGMP über GC-A synthetisiert wird. Die Behandlung mit Sildenafil führt zu keiner signifikanten Erhöhung des cGMP-Gehaltes. N = 5 (GC-A +/+), bzw. N = 8 (GC-A $-/-$) pro Gruppe, abgebildet ist jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler. Mit * gekennzeichnet sind statistisch relevante Unterschiede.

3.3.6.2 Messung des zyklischen Guanosinmonophosphat-Gehaltes in pulmonalem Gewebe

Der in der Lunge gemessene cGMP-Gehalt zeigt deutliche Schwankungen zwischen den Gruppen. Analog zu den Resultaten der cGMP –Messung im linksventrikulären Gewebe ist hier der cGMP-Spiegel in den GC-A $-/-$ Tieren erniedrigt (siehe Abb. 41). Eine

Behandlung mit Sildenafil führt nur in GC-A +/+ Mäusen zu einem signifikanten Anstieg des cGMP-Gehaltes, in GC-A -/- Mäusen wird kein Effekt durch Applikation des Pharmakons sichtbar.

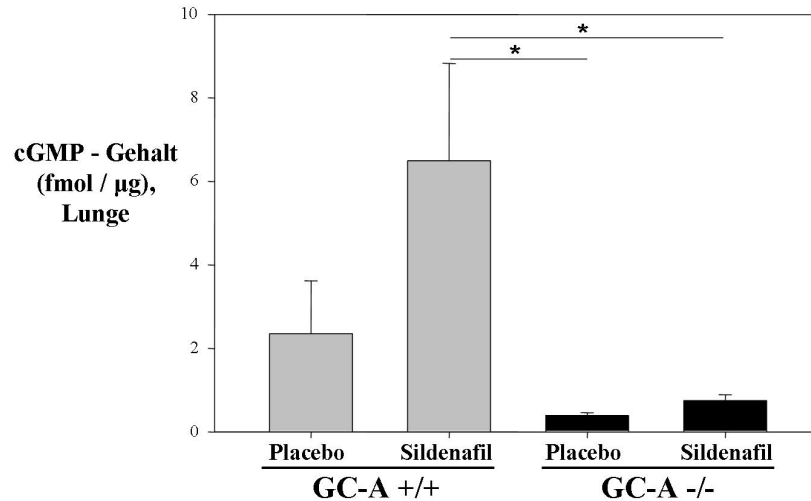


Abb. 41: Im Radioimmunoassay gemessener cGMP-Gehalt (gemessen in fmol pro μg Protein) der Lunge.

Der pulmonale cGMP-Gehalt ist in GC-A+/+ Tieren, die mit Sildenafil behandelt wurden, deutlich erhöht. In den GC-A -/- Tieren ist der cGMP-Gehalt gegenüber den Sildenafil behandelten GC-A +/+ Tieren signifikant erniedrigt. Die Gabe von Sildenafil führt zu keiner signifikanten Erhöhung des cGMP-Spiegels in den GC-A -/- Tieren. N = 5 (GC-A +/+), bzw. N = 8 (GC-A -/-) pro Gruppe, abgebildet ist jeweils der Mittelwert ± Standardfehler.

* kennzeichnet einen p-Wert $\leq 0,05$.

4 Diskussion

4.1 Sildenafil hat keine antihypertrophen Effekte in einem murinen Modell der moderaten Herzhypertrophie nach Transverser Aortenkonstriktion

Die in dieser Dissertation erarbeiteten Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Sildenafil keine direkten antihypertrophen Effekte auf das Myokard hat. Nekropsie, echokardiographische und morphometrische Untersuchungen zeigen die Entwicklung einer konzentrischen Herzhypertrophie ohne Fibrose nach Transverser Aortenkonstriktion (TAC). Die Entwicklung dieser Herzhypertrophie wurde durch Sildenafil nicht verhindert.

4.2 Die Plasmaspiegel von Sildenafil sind im therapeutischen Bereich

Eine unzureichende Therapie mit Sildenafil könnte Ursache der Diskrepanzen zu den Ergebnissen bislang publizierter Studien sein. Ebenso könnten die unterschiedlichen beobachteten Effekte auf Unterschiede bei der Applikation des Pharmakons zurückzuführen sein. So wird in der Studie von Takimoto et al. beispielsweise Sildenafil pulverisiert und mittels einer Magensonde den Mäusen zugeführt (Takimoto et al., 2005b). Gegen eine unzureichende Behandlung spricht jedoch die Bestimmung der Plasmaspiegel von Sildenafil, die mit 60 nM, sowohl über der IC₅₀ von Sildenafil (3,5 nM) als auch über dem mit 10 nM angegebenen Plasmaspiegel der Studien lagen, die positive Effekte beobachtet haben (Takimoto et al., 2005b). Die wirksame intrazelluläre PDE 5 Hemmung konnte zudem durch einen Anstieg von cGMP in Herz und Lunge unter Sildenafil-Therapie festgestellt werden. Ebenso zeugt eine Zunahme der phosphorylierten Fraktion des Tn I und eine Abnahme des systolischen Blutdruckes von GC-A^{-/-} Tieren im zweiten Studienansatz von einer erfolgreichen Applikation des Pharmakons.

Zudem ist auch in Frage zu stellen, welchen Einfluss die in diesem Studienansatz erreichte sechsfache Konzentration von Sildenafil im Plasma verglichen mit der Studie von Takimoto et al. auf die beobachteten Ergebnisse hat, d. h. in welchem Maße die Studienergebnisse von Takimoto et al. mit den Ergebnissen dieser Studie vergleichbar sind. Eine fehlende Wirksamkeit Sildenafil durch übermäßige Zufuhr des Pharmakons ist jedoch aufgrund der in der Einleitung beschriebenen strukturellen Merkmale der PDE 5 unwahrscheinlich. Eine Dosierung von Sildenafil, die über dem therapeutischen Spiegel liegt, führt nicht zu einer Abnahme des intrazellulären cGMPs und kann daher nicht für fehlende protektive Effekte einer cGMP-Erhöhung unter Therapie mit Sildenafil verantwortlich gemacht werden.

4.3 Sildenafil hat keine direkten antihypertrophen Effekte bei moderater Links- oder Rechtsherzhypertrophie

Die fehlende antihypertrophe Wirkung Sildenafil lässt sich in diesem Versuch am wahrscheinlichsten analog zu den Studien von Schäfer et al. und Andersen et al. erklären (Andersen et al., 2008; Schaefer et al., 2009). Diese Studien untersuchen die Wirkung von Sildenafil auf rechtsventrikuläre Hypertrophie. Hervorgerufen wird diese Hypertrophie durch eine pulmonale Hypertonie, die durch Banding der Pulmonalarterien oder medikamentös induziert wurde. Hier werden die antihypertrophen Effekte von Sildenafil den positiven Effekten auf die Hämodynamik, nämlich einem Sinken des Gefäßwiderstandes bzw. der Nachlast, und weniger direkten Effekten an Myozyten zugeschrieben.

Da im Tiermodell mit TAC die Senkung der Nachlast durch einen fest vorgegebenen bestehenden Widerstand in Form der Stenose nicht möglich ist, entfallen die indirekt positiv modulierenden Wirkungen von Sildenafil (im Sinne einer Blutdrucksenkung) am Myokard. Vielmehr zeigen Andersen et al., dass Sildenafil unter konstanter Druckerhöhung die rechtsventrikuläre Hypertrophie nicht mildern, sondern eher verstärken kann.

Diese fehlenden direkten Wirkungen von Sildenafil wären auch mit einer fehlenden oder sehr geringen Expression der PDE 5 in Kardiomyozyten (siehe unten) zu vereinbaren. Ferner wurde eine Suppression der Aktivität der PKG I unter rechtsventrikulärer Hypertrophie festgestellt, was wiederum zur Erklärung der fehlenden direkten antihypertrophen Effekte Sildenafils beitragen könnte (Nagendran et al., 2007).

4.4 Sildenafil hat verschiedene Effekte auf funktionell kompensierte moderate Herzhypertrophie und dekompenzierte massive Herzhypertrophie

Nagayama et al. konnten nachweisen, dass das Ausmaß der Stenose bei TAC und somit der Schweregrad der zusätzlichen Druckbelastung auf den Ventrikel entscheidend ist für den direkten Effekt auf das Myokard. Unter einer schweren zusätzlichen Druckbelastung von etwa 100 mmHg konnte eine Behandlung mit Sildenafil direkt antihypertroph auf das Herzmuskelgewebe wirken. Diese Effekte wurden allerdings bei einer moderaten Stenosierung der Aorta nicht beobachtet (Nagayama et al., 2009). In dieser Studie wird vermutet, dass die spezifischen Signalwege der Herzhypertrophie (wie unter 1.2.2.2 geschildert), welche durch cGMP / PKG I gehemmt werden können (und durch Sildenafil verstärkt werden), erst bei massiver Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz überhaupt aktiviert werden. Bei stark gesteigerter Nachlast des Herzens kommt es zu einer Aktivierung neuroendokriner Systeme im Herzen, wie Ang II und ET-1. Diese führen über $G_{\alpha q}$ Aktivierung zum Ca^{2+} -Einstrom, zur Öffnung von TRPC-Kanälen und zur Aktivierung von CaMK II und Calcineurin (siehe 1.2.2.2). Diese Signalwege werden durch RGS2 gehemmt. PKG I phosphoryliert und aktiviert RGS2 spezifisch und verstärkt so seine hemmende Wirkung auf $G_{\alpha q}$ -Proteine. Es könnte also sein, dass diese Signalwege ($G_{\alpha q}$, RGS2, TRPC) bei moderater, gut kompensierter Herzhypertrophie nicht oder weniger aktiviert sind. Somit wären wichtige Zielproteine des cGMP / PKG I Signalwegs (RGS2, TRPC), welche durch cGMP oder Sildenafil beeinflusst werden könnten, bei kompensierter Herzhypertrophie an Umbauprozessen des Myokards nicht oder wenig beteiligt.

In dieser Studie wurde ein Modell der kompensierten Linksherzhypertrophie untersucht. Im Vergleich dazu wurde in den bislang publizierten Studien die Wirkung von Sildenafil auf eine ausgeprägte Linksherzhypertrophie nach TAC oder Myokardinfarkt betrachtet. Es wurde demnach bislang die Wirkung von Sildenafil in einem System, dessen Kompensationsmechanismen ausgeschöpft sind, untersucht.

Die positiven Effekte der Sildenafiltherapie werden in den Modellen mit ausgeprägter Herzhypertrophie auf eine Erhöhung der Aktivität der PKG I zurückgeführt. Dafür sind sowohl eine suffiziente cGMP-Synthese sowie eine ausreichende Aktivität der PDE 5 vonnöten, die durch Sildenafil gehemmt werden kann. Diese beiden Punkte sind also in unserem Modell, verglichen mit den anderen Ansätzen, zu hinterfragen.

In einem Modell der extremen Stressbelastung nach TAC wäre eine Steigerung der cGMP-Synthese durch höhere zirkulierende Mengen an ANP und BNP (Burnett et al., 1986; Mukoyama et al., 1990) im Vergleich zur Situation nach moderater TAC möglich. Daraus würde eine höhere Aktivierung der PKG I, sowie eine größere Hemmung des Zellwachstums z. B. über Calcineurin-NFAT Signalwege resultieren (Fiedler et al., 2002). Auch andere cGMP-generierende Systeme, wie NO / sGC könnten in einem derartigen Modell kompensatorisch erhöht sein. Eine vergleichsweise geringere cGMP-Synthese und damit geringere Aktivierung der PKG I wäre dann verantwortlich für die fehlenden antihypertrophen Effekte in diesem Studienansatz.

Die Expression und Aktivität der PDE 5 im kardiovaskulären System ist ein umstrittenes Thema. Wahrscheinlich ist, dass die PDE 5 im gesunden Herzen – verglichen mit der Lunge - sehr niedrig exprimiert ist (Corbin et al., 2005; Giordano et al., 2001; Kass et al., 2007) und erst bei Hypertrophie und Insuffizienz verstärkt exprimiert und aktiviert wird (Forfia et al., 2007; Kass et al., 2007). Dies würde erklären, warum in unseren Tieren eine signifikante Erhöhung des cGMP-Gehaltes in der Lunge zu verzeichnen ist, wohingegen diese Erhöhung im linksventrikulären Gewebe nicht signifikant ist.

Fraglich ist weiterhin die Lokalisation und Expression der PDE 5 im Herzgewebe unter verschiedenen Bedingungen. Es gibt tierexperimentelle Ansätze, die vermuten lassen, dass die bislang aus Herzen isolierte PDE 5 lediglich in der glatten Gefäßmuskulatur der

Koronararterien lokalisiert ist und nicht aus den Herzmuskelzellen direkt stammt (Corbin et al., 2005). In Übereinstimmung mit dieser Studie gibt es Arbeiten, die im gesunden Myokard eine Expression der PDE 5 einzig in der Media der Koronarien feststellen, jedoch in hypertrophierten rechten und linken Ventrikeln PDE 5-mRNA und -Protein nachweisen konnten (Nagendran et al., 2007). Im Gegensatz dazu gelang es einer Arbeitsgruppe, eine geringe Menge an PDE 5 in Nähe der Z-Bande der Herzmuskelzelle zu lokalisieren (Takimoto et al., 2005a).

Unsere Ergebnisse sprechen unter der Bedingung der gut kompensierten linksventrikulären Hypertrophie für eine geringer ausgeprägte Expression der PDE 5 im Herzen. Über Veränderungen der Aktivität unter anderen Bedingungen können keine Aussagen getroffen werden.

Dabei gilt es festzuhalten, dass die cGMP-Messungen in dieser Studie aus einem intakten Stück Herz- oder Lungengewebe vorgenommen wurden. Dies bedeutet, dass die Ergebnisse nicht den cGMP-Gehalt des Kardiomyozyten allein widerspiegeln, sondern vielmehr auch der cGMP-Gehalt von Koronarien und anderen Zellen erfasst wird.

In Anlehnung an die Studie von Nagayama et al., worin eine hohe Stressbelastung des Herzens als notwendige Prämisse für einen positiven Effekt der Sildenafiltherapie betrachtet wird, könnten eine fehlende Aktivierung von PKG I / RGS 2-Signalwegen in diesem Versuchsansatz Ursache für die fehlende antihypertrophe Wirkung von Sildenafil sein. In der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivierung von RGS 2 oder von Ca^{2+} -abhängigen Signalwegen der Herzhypertrophie nicht untersucht, so dass dies eine Hypothese bleibt.

Auf den menschlichen Körper bezogen, stellt das TAC-Modell eine Erhöhung der Nachlast im Sinne einer Erhöhung des peripheren Widerstandes im arteriellen Schenkel der Gefäßversorgung dar. Dies ist bei einigen Erkrankungen des hypertensiven Formenkreises ebenso der Fall. Druckerhöhungen von 35 mmHg im Mausmodell sind daher ein realistischer Wert, um sie mit den Erhöhungen des Blutdruckes im Menschen zu vergleichen. In diesem Fall wäre die Applikation von Sildenafil auf der Basis unserer Ergebnisse nur als Alternative zu den gängigen Therapeutika mit dem Ziel der Entlastung des Herzens durch Nachlastsenkung zu sehen.

4.5 Sildenafil steigert bei moderater Herzhypertrophie in einem Modell nach Transverser Aortenkonstriktion die Tendenz zur Herzdysfunktion

Die Applikation von Sildenafil führte tendenziell nach vier Wochen eher zu einer Verschlechterung der linksventrikulären Herzfunktion mit Rückgang der Ejektionsfraktion, einer beginnenden Dilatation des linken Ventrikels und einem gesteigerten Lungenfeuchtgewicht. Diese Verschlechterung der Herzfunktion unter Sildenafil-Behandlung ist bislang nicht beschrieben. Mehrere Mechanismen kommen hierfür potenziell in Frage. Da gezeigt werden konnte, dass unter rechtsventrikulärer Hypertrophie die Aktivität der PKG I supprimiert wird (Nagendran et al., 2007), könnten die mittels Echokardiographie aufgezeigten Effekte eben von dieser PKG-Suppression abhängig sein. Dies würde bedeuten, dass im hypertrophierten Myokard weniger PKG I aktiv ist, was konsekutiv zu einer Abnahme der phosphorylierten Fraktion des Tn I und damit zu einer Abnahme der Lusitropie führen würde. In unserer Studie wird dies an einem deutlichen Rückgang des enddiastolischen Volumens vier Wochen nach TAC sichtbar. Das enddiastolische Volumen ist ein Parameter für die Fähigkeit des Herzens, sich im entspannten Zustand zu füllen. Daher ist dieses Volumen einer der Parameter, die sich bei Entwicklung einer Herzinsuffizienz ändern. Das beobachtete verkleinerte Schlagvolumen und eine verminderte Ejektionsfraktion vier Wochen nach TAC könnten Korrelate einer verminderten Lusitropie sein.

Zwei Wochen nach TAC ist das enddiastolische Volumen in Placebo-behandelten Tieren erniedrigt. Das spricht für eine verminderte Relaxationsfähigkeit des Ventrikels. In Sildenafil-behandelten Tieren ist es jedoch relativ unverändert zum Zeitpunkt vor TAC geblieben, was für eine Steigerung der Lusitropie durch Sildenafil spricht oder zumindest bedeutet, dass Sildenafil einem Verlust der Relaxationsfähigkeit unter gesteigerter Nachlast entgegenwirken kann.

Diese Beobachtung deckt sich auch mit der Erkenntnis, dass Sildenafil durch eine Aktivierung der PKG I einem Verlust der Phosphorylierungsfähigkeit des Titins und damit einer Versteifung des Myokards entgegenwirken kann (Krueger et al., 2009; van Heerebeek et al., 2006).

Eine gesteigerte Fraktion von phosphoryliertem Tn I im Western Blot dieser Studie zeugt ebenso von einer Tendenz, einer Versteifung des Myokards durch Gabe von Sildenafil entgegenzuwirken. Nach vier Wochen der konstanten Nachlaststeigerung durch TAC, gelingt es den mit Sildenafil behandelten Tieren jedoch nicht mehr, die ständige Nachlaststeigerung zu überwinden und das enddiastolische Volumen nimmt weiterhin ab, bzw. erreicht das Niveau der unbehandelten Tiere. Dies zeugt von einem Verlust der Relaxationsfähigkeit bei beständiger Nachlaststeigerung und würde zu der oben beschriebenen Beobachtung passen, dass im hypertrophierten rechten Ventrikel die Aktivität der PKG I verringert ist.

Zudem reguliert PKG I durch Phosphorylierung von Titin den diastolischen Tonus des Herzens, die Dehnbarkeit des linken Ventrikels sowie die Relaxationsgeschwindigkeit. Im diastolischen Herzversagen nimmt die phosphorylierte Fraktion von Titin ab und somit die Steifigkeit des Herzens zu. Das führt zu einer Verminderung der diastolischen Füllung sowie zu einer Verminderung des enddiastolischen Volumens. In Kongruenz zu diesen Beobachtungen zeigen die echokardiographischen Ergebnisse unserer Studie eine Abnahme des enddiastolischen Volumens vier Wochen nach TAC.

Krüger et al. vermuten, dass eine Abnahme der phosphorylierten Fraktion des Titins im Herzversagen durch eine Steigerung des intrazellulären cGMP-Gehaltes, beispielsweise durch Gabe von Sildenafil ausgeglichen werden kann. Dies erscheint aufgrund unserer Daten möglich, ist aber abhängig von einer Änderung der Hämodynamik im Sinne einer Nachlastsenkung. Da das Modell der TAC eine Senkung der Nachlast nicht zulässt, werden positive Effekte wie eine verbesserte Füllung der Ventrikel in der Diastole nicht beobachtet.

Des Weiteren wurde eine Abnahme der fraktionellen Verkürzung der Hinterwand im Sinne einer Abnahme der Kontraktilität des Herzens in dieser Studie festgestellt. Takimoto et al. konnten zeigen, dass die Kontraktilität des Herzens unter β -adrenerger Stimulation abnimmt, da die PDE 2 aktiviert wird, welche cAMP hydrolysiert (Mongillo et al., 2006; Takimoto et al., 2007). Dies geht einher mit der Beobachtung, dass hohe intrazelluläre cGMP-Konzentrationen die Kontraktilität senken, da sie zur vermehrten PKG I-Aktivierung führen. Eine PKG I-Aktivierung führt zur vermehrten Phosphorylierung von TnI, was zu einer Abnahme der Sensitivität der Myofilamente für Ca^{2+} führt und ergo eine Abnahme der Kontraktionskraft zur Folge hat (Takimoto et al.,

2007). Diese Beobachtungen widersprechen den Ergebnissen von Nagendran et al., die eine Verminderung der Aktivität der PKG im hypertrophierten rechten Ventrikel sehen (Nagendran et al., 2007). Der Effekt könnte jedoch ebenso abhängig vom Stadium der Herzhypertrophie sein. D. h. es könnte möglicherweise erst in einem dekompensierten Stadium zum Verlust der Aktivität der PKG I kommen. Dies würde auch eine verminderte PKG I-vermittelte Phosphorylierung von Titin im diastolischen und systolischen Herzversagen erklären (van Heerebeek et al., 2006).

Die Tendenz, eine linksventrikuläre Dysfunktion durch Gabe von Sildenafil zu aggravieren, könnte auch an einem mangelnden Ca^{2+} -Einstrom über L-Typ Ca^{2+} -Kanäle liegen. Denn die PKG I inhibiert den Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle über diesen Kanal (Lohmann et al., 1997). Da Ca^{2+} -Ionen essenziell am Kontraktionsvorgang der Herzmuskelzelle beteiligt sind, könnte der Rückgang der Ejektionsfraktion und damit verbunden der Rückgang der Kontraktionskraft des Herzens unter anderem dadurch begründet werden.

4.6 Sildenafil hat an Mäusen mit globaler Deletion des Guanylylzyklase-A-Rezeptors für Atriales Natriuretisches Peptid leichte antihypertensive aber keine kardialen antihypertrophen Effekte

Einen besonderen Stellenwert haben unsere Untersuchungen an dem monogenetischen Modell der GC-A $-/-$ Mäuse. In diesem Modell ist ein essenzieller Signalweg der cGMP-Bildung im kardiovaskulären System genetisch deletiert. Aufgrund der fehlenden vasodilatierenden, renalen, endothelialen, zentralnervösen und humoralen Effekte von ANP (Kuhn, 2005) haben diese Tiere eine chronische arterielle Hypertonie und Hypervolämie (Lopez et al., 1995).

An GC-A $+/+$ Tieren mit normalem arteriellen Blutdruck hatte Sildenafil keine Effekte auf den systolischen Blutdruck, der diastolische Blutdruck konnte jedoch gesenkt werden. Da auch andere Hypotensiva unter normotensiven Bedingungen den systolischen Blutdruck nicht beeinflussen, ist dies nicht verwunderlich. Der systolische Blutdruck wird in den GC-A $+/+$ Tieren über endogene Systeme erhalten.

Interessanterweise konnte Sildenafil aber einen leichten, wenn auch inkompletten Rückgang der systemischen arteriellen Hypertonie bei GC-A $-/-$ Tieren bewirken. Vermutlich geschieht dies durch Verstärkung der vasodilatierenden Effekte des NO / sGC / cGMP-Signalwegs (da GC-A fehlt). Der hypotensive Effekt war allerdings sehr milde. Dies deutet darauf hin, dass die systemische blutdrucksenkende Wirkung von Sildenafil zu einem großen Teil auf die Synthese von cGMP durch das ANP / GC-A-System angewiesen ist. Mögliche Erklärung dafür wäre, dass vor allem das cGMP, welches durch Aktivierung von ANP / GC-A synthetisiert wird, von der PDE 5 hydrolysiert wird. Fehlt dieser Syntheseweg für cGMP, ist die vasodilatierende Wirkung von Sildenafil abgeschwächt. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, dass die cGMP-Konzentrationen im Herz- und Lungengewebe der GC-A $-/-$ Tiere signifikant gegenüber denen der GC-A $+/+$ Tiere vermindert waren. Durch Gabe von Sildenafil wurde der cGMP-Gehalt in den GC-A $-/-$ Tieren im jeweiligen Gewebe zudem nicht gesteigert, der cGMP-Gehalt in den GC-A $+/+$ Tieren stieg durch Gabe von Sildenafil im pulmonalen jedoch nicht im linksventrikulären Gewebe an.

Auch in diesem Mausmodell wurde die durch den Genotyp bedingte linksventrikuläre Herzhypertrophie durch Sildenafil nicht beeinflusst, obwohl die Nachlast leicht vermindert wurde. Auch hier hatte Sildenafil also im Gegensatz zu den zuvor erwähnten publizierten Studien (Takimoto et al., 2005b) keinen direkten kardialen antihypertrophen Effekt. Da für ANP / GC-A / cGMP in vitro und in vivo antihypertrophe Effekte beschrieben wurden, könnte deren Ausbleiben unter Sildenafil darauf beruhen, dass auch im Herzen dieser Syntheseweg für cGMP fehlt. Dies würde den Schluss erlauben, dass die antihypertrophen Effekte Sildenafil auf einer Verstärkung des ANP / GC-A Systems beruhen.

Möglich ist allerdings auch eine fehlende Aktivierung cGMP-modulierter Signalwege (RGS2, TRPC) unter kompensierter Herzhypertrophie und mangelnder Aktivierung von Stresssignalen (AT II, ET-1). Gegen Letzteres sprechen viele publizierte Beobachtungen: das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System ist im Herzen von GC-A $-/-$ Tieren aktiviert und trägt lokal (über G_{α_q} -Rezeptoren) zu der Herzhypertrophie dieser Tiere bei (Vellaichamy et al., 2007). Auch andere an der Transduktion hypertropher

Signale beteiligte Mediatoren, wie beispielsweise CaMKII und Calcineurin sind in diesen Tieren deutlich aktiviert (Kilic et al., 2005).

Letztlich bleibt auch in diesem Versuchansatz die mögliche Erklärung bestehen, dass PDE 5 im Herzen keine große funktionelle Bedeutung hat und ein Hemmstoff dieser PDE 5 daher in Kardiomyozyten die cGMP-Spiegel kaum modulieren kann (siehe oben).

Ein besonderes Augenmerk fällt auf die für den Phänotyp der GC-A defizienten Mäuse beschriebene Hypertrophie des rechten Ventrikels, die durch eine Widerstandserhöhung im Lungenkreislauf der GC-A -/- Tiere verursacht wird (Lopez et al., 1997). Diese rechtsventrikuläre Hypertrophie wird durch Sildenafilgabe nicht verringert (Kishimoto et al., 2001; Klinger et al., 2002). Dies spricht dafür, dass das ANP / GC-A System nicht nur bei der Regulation des systemischen, sondern auch bei der Regulation des pulmonalen Blutdruckes eine Rolle spielt.

Diese Beobachtung ist insbesondere wichtig, da Sildenafil zur Behandlung der pulmonalen arteriellen Hypertonie, sowie einer dekompensierten Herzinsuffizienz aufgrund eines Linksherzversagens in der Praxis zur Anwendung kommt (Kass et al., 2007). Der fehlende Einfluss von Sildenafil auf die pulmonale Hypertonie an GC-A defizienten Tieren (Zhao et al., 2003) belegt, dass gerade im pulmonalen System das ANP / GC-A-System der wichtigste cGMP-Lieferant ist. Dieses über GC-A synthetisierte cGMP scheint nun hauptsächlich für die hemmende Wirkung von Sildenafil auf rechtsventrikuläre Hypertrophie und Muskularisierung der peripheren pulmonalen Gefäße verantwortlich zu sein. Zugleich ist über NO / sGC synthetisiertes cGMP auch essenziell für positive Effekte auf die Hämodynamik im Sinne einer Regulation des Vasotonus (Muramatsu et al., 1997; Zhao et al., 2001; Zhao et al., 2003). Dies würde erklären, warum in unserem Versuchansatz hauptsächlich eine NO-vermittelte Wirkung von cGMP auf den Vasotonus beobachtet wurde. D. h. es wurden Wirkungen von Sildenafil auf die Regulation des Gefäßtonus im Sinne eines Sinkens des systolischen, bzw. diastolischen Blutdruckes beobachtet, während direkte Wirkungen von cGMP auf das Kardiomyozytenwachstum nicht beobachtet wurden.

Das ANP / GC-A System kann also durch Gabe von Sildenafil verstärkt werden. In Abwesenheit des GC-A Rezeptors für ANP kann Sildenafil aber den Hochdruck in der Lungenstrombahn nicht mindern und bei konstanter Nachlast bleibt eine Rechtsherzhypertrophie bestehen.

4.7 Fazit der Dissertation

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Dissertation, dass Sildenafil bei einer kompensierten, moderaten Herzhypertrophie keine direkten antihypertrophen Effekte am Herzen ausübt. Obwohl dies negative Beobachtungen sind, die im Widerspruch zu bereits publizierten Studien stehen, sind es wichtige Daten. Sie deuten darauf hin, dass eine Therapie mit Sildenafil bei Patienten mit moderater essenzieller arterieller Hypertonie und Herzhypertrophie (ohne Herzinsuffizienz) möglicherweise nicht nur obsolet sondern sogar prekär sein könnte. Aufgrund der zuvor zitierten Beobachtungen an Nagern (Takimoto et al., 2005b; Takimoto et al., 2009) wurde im September 2008 in den USA eine multizentrische klinische Studie (RELAX) zur Beurteilung der Folgen auf den Gesundheitszustand und die Leistungsfähigkeit von Patienten mit diastolischer Herzinsuffizienz unter Behandlung mit Sildenafil initiiert. Die Studie soll im März 2010 abgeschlossen werden. Es bleibt abzuwarten, ob Sildenafil in dieser Studie positive Wirkungen zeigen kann.

5 Zusammenfassung

Myokardhypertrophie stellt einen Adaptationsmechanismus des Herzens an erhöhte Belastungen wie chronische arterielle Hypertonie, Myokardinfarkt, Koronare Herzkrankheit, Myokarditis und Kardiomyopathien dar. Sowohl biomechanische als auch neurohumorale Stimuli führen auf einer Reihe von Signalwegen zur Myokardhypertrophie, die als Größenzunahme postmitotischer Kardiomyozyten definiert ist.

Zyklisches 3'5'-Guanosinmonophosphat ist ein ubiquitärer intrazellulärer Signalträger, der im kardiovaskulären System auf mindestens drei bekannten Wegen aus Guanosintriphosphat durch Abspaltung von Pyrophosphat synthetisiert wird. Die Synthese erfolgt unter anderem durch Aktivierung der partikulären, membranständigen Guanylylzyklase A durch Atriales Natriuretisches Peptid oder „B-Typ“ Natriuretisches Peptid und der Guanylylzyklase B, durch „C-Typ“ Natriuretisches Peptid.

Des Weiteren wird über neuronale, endotheliale, oder induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase Stickstoffmonoxid synthetisiert, welches die lösliche, vorwiegend zytosolisch lokalisierte Guanylylzyklase aktiviert, die wiederum aus Guanosintriphosphat zyklisches 3'5'-Guanosinmonophosphat synthetisiert.

Das intrazelluläre zyklische 3'5'-Guanosinmonophosphat lässt sich durch Behandlung mit Sildenafilcitrat, einem unter dem Markennamen Viagra® zur Therapie der Erektile Dysfunktion und Revatio® zur Therapie der pulmonalen arteriellen Hypertonie zugelassenem Pharmakon, erhöhen. Sildenafil hemmt die Phosphodiesterase 5A, ein unter anderem in Lunge, Kardiomyozyten, Kleinhirn und glatter Muskulatur vorkommendes Isoenzym.

In der vorliegenden Dissertation wurden die kardialen Effekte des Phosphodiesterase 5-Inhibitors Sildenafil an zwei Mausmodellen mit funktionell gut kompensierter Herzhypertrophie getestet. Die mittlere Tagesdosis betrug 150 (Studie 1) bzw. 240 (Studie 2) mg/kg Körpergewicht Sildenafil, in Anlehnung an publizierte Studien mit Nagern (Takimoto et al., 2005b). Diese Dosis wurde oral über vier (Studie 1) bzw. neun Wochen (Studie 2) zugeführt. Die mittlere Plasmakonzentration von Sildenafil lag mit 60 nM weit über dessen IC₅₀ (3,5 nM) zur Hemmung der PDE 5 in vitro.

Studie 1

In der ersten Studie wurde die Nachlast des Herzens mittels operativer transverser Aortenkonstriktion um ca. 25 - 35 mmHg über vier Wochen erhöht. Vergleichbare Anstiege des systolischen Blutdrucks werden in Patienten mit ausgeprägter essenzieller arterieller Hypertonie gemessen. Nekropsie, echokardiographische, histologische und morphometrische Untersuchungen zeigten übereinstimmend die Entwicklung einer konzentrischen Herzhypertrophie ohne interstitielle Fibrose. Echokardiographische Bestimmungen der linksventrikulären Funktion zeigten einen leichten Anstieg der Ejektionsfraktion bei unveränderter fraktioneller Verkürzung der Wand des linken Ventrikels. Proteinchemische Analysen an linksventrikulären Gewebeproben zeigen die Aktivierung von Signalwegen der Herzhypertrophie, insbesondere der Mitogen-Aktivierten Protein Kinase ERK 1 / 2. Zusammengenommen belegen diese morphologischen, funktionellen und biochemischen Analysen, dass durch die moderate operative Aortenstenose die Entwicklung einer ausgeprägten, aber funktionell gut kompensierten Linksherzhypertrophie induziert wurde. Die Entwicklung dieser Herzhypertrophie wurde durch Sildenafil nicht verhindert. Im Gegenteil, es zeigte sich unter der Gabe des Pharmakons sogar eine leichte Tendenz zur funktionellen Verschlechterung des linken Ventrikels, mit leicht reduzierter Ejektionsfraktion und gesteigertem Lungenfeuchtgewicht. Auch die kardiale Aktivierung des Hypertrophiesignalweges MAPK / ERK wurde durch Sildenafil nicht beeinflusst.

Studie 2

In der zweiten Studie wurden die Effekte von Sildenafil an einem monogenetischen Mausmodell mit globaler Deletion der Guanylylzyklase-A (GC-A -/-), dem Rezeptor für Atriales natriuretisches Peptid, getestet. Wie zuvor in publizierten Studien gezeigt wurde, haben GC-A -/- Mäuse eine chronische arterielle Hypertonie, mit Anstiegen des systolischen Blutdrucks um 20 - 25 mmHg. Nekropsie, Echokardiographie, Histologie und Morphometrie ergaben übereinstimmend, dass diese arterielle Hypertonie von einer ausgeprägten globalen, funktionell gut kompensierten Herzhypertrophie mit leichter interstitieller Fibrose begleitet wurde. Unter der neunwöchigen Behandlung mit Sildenafil kam es zu einem signifikanten aber inkomplettem Rückgang der systemischen arteriellen Hypertonie (um ca 8 - 10 mmHg). Trotz dieser hypotensiven Effekte wurden die Rechts- und Linksherzhypertrophie und die kardiale Fibrose der

GC-A -/- Tiere durch Sildenafil nicht beeinflusst. Dagegen zeigte sich auch hier mittels Echokardiographie eine leichte Verschlechterung der linksventrikulären Funktion unter Sildenafil, mit Abnahmen der Ejektionsfraktion und der fraktionellen Verkürzung des linken Ventrikels sowie einer Zunahme des endsystolischen Kammerdurchmessers.

Zusammenfassend wurden die in der Literatur beschriebenen protektiven, kardialen antihypertrophen Effekte von Sildenafil in der vorliegenden experimentellen Dissertation nicht bestätigt.

6 Anhang

6.1 Technische Geräte

Echokardiographiegerät Typ Aplio	Siemens
Elektrophoresekammer	Hofer Scientific Instruments
Feinwaage	Sartorius Instruments
MiniVent Mouse Ventilator	Harvard Apparatus
Mikroskop (Operation / Präparation)	Leitz
Mikroskop (Morphometrie)	Typ BX 41, Olympus
Mikroskop (Kollagenfasergehalt)	Typ Axioplan, Zeiss
Mikro-Dismembrator U	Sartorius Instruments
Softron Indirect Blood Pressure Meter BP-98 A	Softron Co. LTd, Tokio, Japan
Speedvac	Bachofer
Statham-Druck-Messer	AD Instruments GmbH
Transferkammer	Biometra
Victor ² –Multi-Label Counter	Wallac / Perkin-Elmer
Zentrifuge – Biofuge fresco	Heraeus Instruments
γ – Counter	Immundiagnostik

6.2 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Eppendorf Microtubes 1,5 / 2 ml	Eppendorf AG
Flüssigstickstoff	Linde AG
Filterpapier	Whatman GmbH
Isofluran, Forene®	Abott GmbH
Kanülen, 23 und 26 G	B. Braun Melsungen AG
Medizinisches Carbogen	Linde AG
Nitrozellulose-Folie, Protran®	Whatman, Schleicher und Schuell
RIA-Tubes 4,5 ml	Sarstedt AG & Co.

Röntgenfilm, Hyperfilm™ ECL

GE Healthcare Limited, UK

Sauerstoff

Linde AG

TBC-Spritzen

Dispomed

Futter

SNIFF Spezialdiäten GmbH

6.3 Verwendete Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien waren mindestens von analytischem Reinheitsgrad.
Sie werden hier nach Bezugsquellen sortiert aufgeführt.

Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe

70% Ethanol, unvergällt

Rotiphorese-Gel 40 (19:1 Acrylamid: Bisacrylamid)

Fluka

Bromphenolblau

SDS

GERBU, Gaiberg

Rinderserumalbumin (BSA)

Immundiagnostik, Bensheim

¹²⁵J

Merck KGaA, Darmstadt

Brenztraubensäure-Natriumsalz

CaCl₂ x 2 H₂O

D(+)-Glucose-Monohydrat

EDTA

Essigsäureanhydrid

Formaldehyd (37%)

Glycerin

30% HCl

Isopropanol

KCl

KH_2PO_4

Kupfersulfat

20 % Methanol

2-Mercaptoethanol

$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$

NaCl

Natriumacetat

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$

NaHCO_3

Triethylamin

Pfizer GmbH, Berlin

Sildenafiltabletten

Sigma

APS

NaF

TRIZMA Base

Tris (hydroxymethyl)-aminomethan Ultra Pure

γ – Globulin

TEMED

Tween

Töpfer

Naturaflor Magermilchpulver

Uptima powered by Interchim

BC-Assay Kit

6.4 Verwendete Lösungen und Antikörper

6.4.1 Bei der Nekropsie und Organentnahme verwendete Lösungen

Krebs-Henseleit-Lösung (21)

NaCl	13,8 g
NaHCO ₃	4,18 g
KCl	0,70 g
KH ₂ PO ₄	0,32 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,81 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,74 g
Brenztraubensäure- Natriumsalz	0,44 g
D(+)-Glucose- Monohydrat	2,18 g

Formalin-Lösung

10% Formaldehyd in PBS

PBS

NaCl 137mM	8,0 g/l
KCl 2,7mM	0,2 g/l
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 8,1mM	1,44 g/l
KH ₂ PO ₄ 1,5mM	0,2 g/l

6.4.2 Lösungen für die Homogenisierung des Gewebes

Lysis-Puffer

10 mM NaHCO ₃	1 Teil
20 % SDS	2 Teile

Puffer für die Homogenisierung des linksventrikulären Gewebes

1.5 M Tris-HCl pH 8,8	2 ml
0.5 M EDTA pH 8,0	1 ml
1M NaF	3 ml
20 % SDS	15 ml
Glycerol	10 ml
Aquadest	69 ml

Lämmli-Puffer (2-fach)

0.5 M Tris-HCl pH 6.8	2,5 ml
10 % SDS	4 ml
2-Mercaptoethanol	1 ml
Glycerol	2 ml
Bromphenolblau (0,01%)	1 mg

6.4.3 Im Western Blot verwendete Lösungen

(Mengenangaben für die Gele ergeben zwei Gele)

Trenngel 12 %

Rotiphorese-Gel	18 ml
1M Tris-HCl pH 8,8	22,4 ml
Aquadest	18,8 ml
10 % SDS	600 µl
TEMED	60 µl
APS	1,2 ml

Sammelgel 5 %

Rotiphorese-Gel	3,25 ml
1M Tris-HCl pH 6.8	2,9 ml
Aquadest	18,5 ml
10 % SDS	250 µl
TEMED	25 µl
APS	500 µl

Laufpuffer

TRIZMA Base	3,1 g
SDS	1 g
Glycin	14,4 g

Transferpuffer

TRIZMA Base	3,03 g
Glycin	14,41 g
20 % Methanol	200 ml

Lauf- und Transferpuffer werden mit Aquadest auf 1l aufgefüllt.

TBS (10-facher Ansatz, 1 l)

TRIZMA Base	24,2 g
NaCl	80,8 g

Mit 30 % HCl auf pH 7,6 titriert

TBS-T

0,1 % Tween in TBS-Lösung

Blocking-Solution / Verdünnungslösung für den Zweitantikörper

5 % Magermilchpulver in TBS-T-Lösung

Antikörperverdünnungslösung

5 % Rinderserumalbumin in TBS-T-Lösung

6.4.4 Im Western Blot verwendete Antikörper

Erstantikörper

p 44/42 MAP Kinase (ERK) Antibody, #9102, Cell Signaling Technology Inc.;

Phospho-p44/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204) Antibody, #9101, Cell Signaling Technology Inc.;

Troponin I Antibody, #4002, Cell Signaling Technology Inc.;

Phospho-Troponin I (Cardiac) (Ser23/24) Antibody, #4004, Cell Signaling Technology Inc.;

Zweitantikörper

ECL™ Anti-Rabbit IgG Horseradish peroxidase linked whole antibody from donkey, GE Healthcare Limited;

6.4.5 Im Radioimmunoassay verwendete Lösungen

Acetylierungsgemisch T/E

2 Teile Triethylamin

1 Teil Essigsäureanhydrid

Tris/HCl 100 mM (Stamm)

6,057 g Tris Ultra pure auf 500 ml Aqua dest.,
mit HCl auf pH 7,4 einstellen, bei 4°C lagern,
für die Gebrauchslösung 1:10 verdünnen;

Natriumacetat 50 mM, pH 6,0

4,1 g Natriumacetat (wasserfrei) auf 1 Liter Aqua dest,
mit Eisessig (98 %) auf pH 6,0 einstellen, bei 4°C lagern;

6.4.6 Gebrauchsfertige Lösungen

Pierce ECL Western Blotting Substrate, PIERCE;

BCA –Reagenz

50 Teile BCA-Reagent A (Uptima powered by Interchim)

1 Teil 4 % Kupfersulfat;

Proteinmarker IV (für Western Blot) peqGOLD, peqLab;

6.5 Verwendete Software

Cell M

Olympus

Image J

National Institutes of Health

Excel

Microsoft

KS 300

Carl Zeiss Microimaging GmbH

SPSS 14.0

SPSS Inc.

Tos-e-bas Digital Ultrasound Lab

Toshiba

6.6 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen der SI-Einheiten werden als bekannt vorausgesetzt.

Nicht aufgeführte Abkürzungen werden im Text erläutert.

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
bpm	beats per minute
Ca ²⁺	Calcium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches 3'5' Guanosinmonophosphat
EDD	enddiastolischer Diameter
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EDV	enddiastolisches Volumen
EF	Ejektionsfraktion
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
ERK	Extrazellulär Regulierte Kinase
ESD	endsystolischer Diameter
ESV	endsystolisches Volumen
FS	Fraktionelle Verkürzung des linken Ventrikels
G	Gravitationskonstante
GC-A	Guanylyzyklase A
GC-A+/+	Mausstamm mit vorhandener GC-A, Wildtyp
GC-A-/-	GC-A-defizienter Mausstamm
GTP	Guanosintriphosphat
HG	Herzgewicht
HZV	Herzzeitvolumen
IC50	mittlere inhibitorische Konzentration (eines Pharmakons)
IVSD	interventrikuläre Septumdicke in der Diastole
IVSS	interventrikuläre Septumdicke in der Systole
JNK	C-junktionale N-terminale Protein Kinase

KGW	Körpergewicht
KMD	Kardiomyozytendurchmesser
LV	linker Ventrikel des Herzens
MAPK	Mitogen-activated-Protein-Kinase
N	Anzahl
NFAT	Nuclear Factor of activated T-cells
MW	Mittelwert
MWU	Mann-Whitney-U-Test
NO	Stickstoffmonoxid
NP	Natriuretisches Peptid
NPR-A	Natriuretic Peptid Receptor-A
p	phosphoryliert
PDE	Phosphodiesterase
PKG-I	Proteinkinase G I
PWD	linksventrikuläre Hinterwandstärke in der Diastole
PWS	linksventrikuläre Hinterwandstärke in der Systole
RIA	Radioimmunoassay
rpm	rounds per minute
RV	rechter Ventrikel des Herzens
s.	siehe
SBD	systolischer Blutdruck
SEM	Standardfehler, Standard Error of the Mean
sGC	lösliche Guanylyzyklase
SV	Schlagvolumen
TAC	Transverse Aortenkonstriktion
Tn I	Troponin I
WRT	Wilcoxon-Rangtest

7 Literaturverzeichnis

Andersen, A., Nielsen, J.M., Peters, C.D., Schou, U.K., Sloth, E., und Nielsen-Kudsk, J.E. (2008). Effects of phosphodiesterase-5 inhibition by sildenafil in the pressure overloaded right heart. *Eur J Heart Fail* 10, 1158-1165.

Barbee, R.W., Perry, B.D., Re, R.N., Murgu, J.P., und Field, L.J. (1994). Hemodynamics in transgenic mice with overexpression of atrial natriuretic factor. *Circulation research* 74, 747-751.

Bender, A.T., und Beavo, J.A. (2006). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacological reviews* 58, 488-520.

Biel, M., Zong, X., Distler, M., Bosse, E., Klugbauer, N., Murakami, M., Flockerzi, V., und Hofmann, F. (1994). Another member of the cyclic nucleotide-gated channel family, expressed in testis, kidney, and heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 3505-3509.

Blumenthal, D.K., Stull, J.T., und Gill, G.N. (1978). Phosphorylation of cardiac troponin by guanosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *The Journal of biological chemistry* 253, 324-326.

Bortz J. (2005). *Statistik (für Human- und Sozialwissenschaftler)*, 6 edn (Heidelberg, Springer Medizin Verlag).

Bortz J., L.G. (2003). *Kurzgefasste Statistik für die Klinische Forschung (Leitfaden für die verteilungsfreie Analyse kleiner Stichproben)*, 2. Auflage (Heidelberg, Springer Medizin Verlag).

Bubikat, A., De Windt, L.J., Zetsche, B., Fabritz, L., Sickler, H., Eckardt, D., Godecke, A., Baba, H.A., und Kuhn, M. (2005). Local atrial natriuretic peptide signaling prevents hypertensive cardiac hypertrophy in endothelial nitric-oxide synthase-deficient mice. *The Journal of biological chemistry* 280, 21594-21599.

Bueno, O.F., van Rooij, E., Molkentin, J.D., Doevendans, P.A., und De Windt, L.J. (2002). Calcineurin and hypertrophic heart disease: novel insights and remaining questions. *Cardiovascular research* 53, 806-821.

Burnett, J.C., Jr., Kao, P.C., Hu, D.C., Heser, D.W., Heublein, D., Granger, J.P., Opgenorth, T.J., und Reeder, G.S. (1986). Atrial natriuretic peptide elevation in congestive heart failure in the human. *Science (New York, NY)* 231, 1145-1147.

Castro, L.R., Verde, I., Cooper, D.M., und Fischmeister, R. (2006). Cyclic guanosine monophosphate compartmentation in rat cardiac myocytes. *Circulation* 113, 2221-2228.

Cheitlin, M.D., Hutter, A.M., Jr., Brindis, R.G., Ganz, P., Kaul, S., Russell, R.O., Jr., und Zusman, R.M. (1999). ACC/AHA expert consensus document. Use of sildenafil

(Viagra) in patients with cardiovascular disease. American College of Cardiology/American Heart Association. *Journal of the American College of Cardiology* 33, 273-282.

Coquil, J.F., Franks, D.J., Wells, J.N., Dupuis, M., und Hamet, P. (1980). Characteristics of a new binding protein distinct from the kinase for guanosine 3':5'-monophosphate in rat platelets. *Biochimica et biophysica acta* 631, 148-165.

Corbin, J.D., Beasley, A., Blount, M.A., und Francis, S.H. (2005). High lung PDE5: a strong basis for treating pulmonary hypertension with PDE5 inhibitors. *Biochemical and biophysical research communications* 334, 930-938.

Craven, R. (2007). Ketamine. *Anaesthesia* 62 *Suppl 1*, 48-53.

du Toit, E.F., Rossouw, E., Salie, R., Opie, L.H., und Lochner, A. (2005). Effect of sildenafil on reperfusion function, infarct size, and cyclic nucleotide levels in the isolated rat heart model. *Cardiovasc Drugs Ther* 19, 23-31.

Ellmers, L.J., Scott, N.J., Pihola, J., Maeda, N., Smithies, O., Frampton, C.M., Richards, A.M., und Cameron, V.A. (2007). Npr1-regulated gene pathways contributing to cardiac hypertrophy and fibrosis. *Journal of molecular endocrinology* 38, 245-257.

Farah, C.S., und Reinach, F.C. (1995). The troponin complex and regulation of muscle contraction. *Faseb J* 9, 755-767.

Feil, R., Lohmann, S.M., de Jonge, H., Walter, U., und Hofmann, F. (2003). Cyclic GMP-dependent protein kinases and the cardiovascular system: insights from genetically modified mice. *Circ Res* 93, 907-916.

Ferreira-Melo, S.E., Yugar-Toledo, J.C., Coelho, O.R., De Luca, I.M., Tanus-Santos, J.E., Hyslop, S., Irigoyen, M.C., und Moreno, H., Jr. (2006). Sildenafil reduces cardiovascular remodeling associated with hypertensive cardiomyopathy in NOS inhibitor-treated rats. *Eur J Pharmacol* 542, 141-147.

Fiedler, B., Lohmann, S.M., Smolenski, A., Linnemuller, S., Pieske, B., Schroder, F., Molkentin, J.D., Drexler, H., und Wollert, K.C. (2002). Inhibition of calcineurin-NFAT hypertrophy signaling by cGMP-dependent protein kinase type I in cardiac myocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 11363-11368.

Fiedler, B., und Wollert, K.C. (2004). Interference of antihypertrophic molecules and signaling pathways with the Ca²⁺-calcineurin-NFAT cascade in cardiac myocytes. *Cardiovascular research* 63, 450-457.

Fischmeister, R., Castro, L.R., Abi-Gerges, A., Rochais, F., Jurevicius, J., Leroy, J., und Vandecasteele, G. (2006). Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: the role of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Circulation research* 99, 816-828.

Forfia, P.R., Lee, M., Tunin, R.S., Mahmud, M., Champion, H.C., and Kass, D.A. (2007). Acute phosphodiesterase 5 inhibition mimics hemodynamic effects of B-type natriuretic peptide and potentiates B-type natriuretic peptide effects in failing but not normal canine heart. *Journal of the American College of Cardiology* 49, 1079-1088.

Francis, S.H., Bessay, E.P., Kotera, J., Grimes, K.A., Liu, L., Thompson, W.J., and Corbin, J.D. (2002). Phosphorylation of isolated human phosphodiesterase-5 regulatory domain induces an apparent conformational change and increases cGMP binding affinity. *The Journal of biological chemistry* 277, 47581-47587.

Franco, F., Dubois, S.K., Peshock, R.M., and Shohet, R.V. (1998). Magnetic resonance imaging accurately estimates LV mass in a transgenic mouse model of cardiac hypertrophy. *The American journal of physiology* 274, H679-683.

Giordano, D., De Stefano, M.E., Citro, G., Modica, A., and Giorgi, M. (2001). Expression of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) in mouse tissues and cell lines using an antibody against the enzyme amino-terminal domain. *Biochimica et biophysica acta* 1539, 16-27.

Gomez, M.F., Bosc, L.V., Stevenson, A.S., Wilkerson, M.K., Hill-Eubanks, D.C., and Nelson, M.T. (2003). Constitutively elevated nuclear export activity opposes Ca²⁺-dependent NFATc3 nuclear accumulation in vascular smooth muscle: role of JNK2 and Crm-1. *The Journal of biological chemistry* 278, 46847-46853.

Hansen, C.A., Schroering, A.G., Carey, D.J., and Robishaw, J.D. (1994). Localization of a heterotrimeric G protein gamma subunit to focal adhesions and associated stress fibers. *J Cell Biol* 126, 811-819.

Hassan, M.A., and Ketat, A.F. (2005). Sildenafil citrate increases myocardial cGMP content in rat heart, decreases its hypertrophic response to isoproterenol and decreases myocardial leak of creatine kinase and troponin T. *BMC Pharmacol* 5, 10.

Heineke, J., and Molkenin, J.D. (2006). Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 589-600.

Hofmann, F., Feil, R., Kleppisch, T., and Schlossmann, J. (2006). Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. *Physiological reviews* 86, 1-23.

Holtwick, R., Gotthardt, M., Skryabin, B., Steinmetz, M., Potthast, R., Zetsche, B., Hammer, R.E., Herz, J., and Kuhn, M. (2002). Smooth muscle-selective deletion of guanylyl cyclase-A prevents the acute but not chronic effects of ANP on blood pressure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 7142-7147.

Holtwick, R., van Eickels, M., Skryabin, B.V., Baba, H.A., Bubikat, A., Begrow, F., Schneider, M.D., Garbers, D.L., and Kuhn, M. (2003). Pressure-independent cardiac hypertrophy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of the atrial natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A. *The Journal of clinical investigation* 111, 1399-1407.

Huang, P.L., Huang, Z., Mashimo, H., Bloch, K.D., Moskowitz, M.A., Bevan, J.A., and Fishman, M.C. (1995). Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 377, 239-242.

Hyland, R., Roe, E.G., Jones, B.C., and Smith, D.A. (2001). Identification of the cytochrome P450 enzymes involved in the N-demethylation of sildenafil. *British journal of clinical pharmacology* 51, 239-248.

Jang, H.S., Choi, H.S., Lee, S.H., Jang, K.H., and Lee, M.G. (2009). Evaluation of the anaesthetic effects of medetomidine and ketamine in rats and their reversal with atipamezole. *Veterinary anaesthesia and analgesia* 36, 319-327.

Kass, D.A., Champion, H.C., and Beavo, J.A. (2007). Phosphodiesterase type 5: expanding roles in cardiovascular regulation. *Circulation research* 101, 1084-1095.

Kato, T., Sano, M., Miyoshi, S., Sato, T., Hakuno, D., Ishida, H., Kinoshita-Nakazawa, H., Fukuda, K., and Ogawa, S. (2000). Calmodulin kinases II and IV and calcineurin are involved in leukemia inhibitory factor-induced cardiac hypertrophy in rats. *Circulation research* 87, 937-945.

Kaupp, U.B., and Seifert, R. (2002). Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiological reviews* 82, 769-824.

Kilic, A., Velic, A., De Windt, L.J., Fabritz, L., Voss, M., Mitko, D., Zwiener, M., Baba, H.A., van Eickels, M., Schlatter, E., *et al.* (2005). Enhanced activity of the myocardial Na⁺/H⁺ exchanger NHE-1 contributes to cardiac remodeling in atrial natriuretic peptide receptor-deficient mice. *Circulation* 112, 2307-2317.

Kishimoto, I., Rossi, K., and Garbers, D.L. (2001). A genetic model provides evidence that the receptor for atrial natriuretic peptide (guanylyl cyclase-A) inhibits cardiac ventricular myocyte hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 2703-2706.

Klinger, J.R., Warburton, R.R., Pietras, L., Oliver, P., Fox, J., Smithies, O., and Hill, N.S. (2002). Targeted disruption of the gene for natriuretic peptide receptor-A worsens hypoxia-induced cardiac hypertrophy. *American journal of physiology* 282, H58-65.

Koitabashi, N., Aiba, T., Hesketh, G.G., Rowell, J., Zhang, M., Takimoto, E., Tomaselli, G.F., and Kass, D.A. (2009). Cyclic GMP/PKG-dependent inhibition of TRPC6 channel activity and expression negatively regulates cardiomyocyte NFAT activation Novel mechanism of cardiac stress modulation by PDE5 inhibition. *Journal of molecular and cellular cardiology*.

Krueger, M., Kotter, S., Grutzner, A., Lang, P., Andresen, C., Redfield, M.M., Butt, E., dos Remedios, C.G., and Linke, W.A. (2009). Protein kinase G modulates human myocardial passive stiffness by phosphorylation of the titin springs. *Circulation research* 104, 87-94.

Krueger, M., und Linke, W.A. (2009). Titin-based mechanical signalling in normal and failing myocardium. *Journal of molecular and cellular cardiology* 46, 490-498.

Krueger, M., Kotter, S., Grutzner, A., Lang, P., Andresen, C., Redfield, M.M., Butt, E., dos Remedios, C.G., und Linke, W.A. (2009). Protein kinase G modulates human myocardial passive stiffness by phosphorylation of the titin springs. *Circulation research* 104, 87-94.

Kuhn, M. (2005). Cardiac and intestinal natriuretic peptides: insights from genetically modified mice. *Peptides* 26, 1078-1085.

Kukreja, R.C. (2007). Cardiovascular protection with sildenafil following chronic inhibition of nitric oxide synthase. *British journal of pharmacology* 150, 538-540.

Kukreja, R.C., Ockaili, R., Salloum, F., Yin, C., Hawkins, J., Das, A., und Xi, L. (2004). Cardioprotection with phosphodiesterase-5 inhibition--a novel preconditioning strategy. *Journal of molecular and cellular cardiology* 36, 165-173.

Kuwahara, M., Sugano, S., Yayou, K., Tsubone, H., und Kobayashi, H. (1991). Evaluation of a new tail-cuff method for blood pressure measurements in rats with special reference to the effects of ambient temperature. *Jikken Dobutsu* 40, 331-336.

Layland, J., Solaro, R.J., und Shah, A.M. (2005). Regulation of cardiac contractile function by troponin I phosphorylation. *Cardiovascular research* 66, 12-21.

Li, L., Desantiago, J., Chu, G., Kranias, E.G., und Bers, D.M. (2000). Phosphorylation of phospholamban and troponin I in beta-adrenergic-induced acceleration of cardiac relaxation. *American journal of physiology* 278, H769-779.

Lincoln, T.M., Wu, X., Sellak, H., Dey, N., und Choi, C.S. (2006). Regulation of vascular smooth muscle cell phenotype by cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase. *Front Biosci* 11, 356-367.

Linke, W.A. (2008). Sense and stretchability: the role of titin and titin-associated proteins in myocardial stress-sensing and mechanical dysfunction. *Cardiovascular research* 77, 637-648.

Lohmann, S.M., Vaandrager, A.B., Smolenski, A., Walter, U., und De Jonge, H.R. (1997). Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends in biochemical sciences* 22, 307-312.

Lopez, M.J., Garbers, D.L., und Kuhn, M. (1997). The guanylyl cyclase-deficient mouse defines differential pathways of natriuretic peptide signaling. *The Journal of biological chemistry* 272, 23064-23068.

Lopez, M.J., Wong, S.K., Kishimoto, I., Dubois, S., Mach, V., Friesen, J., Garbers, D.L., und Beuve, A. (1995). Salt-resistant hypertension in mice lacking the guanylyl cyclase-A receptor for atrial natriuretic peptide. *Nature* 378, 65-68.

Lorell, B.H., und Carabello, B.A. (2000). Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation* 102, 470-479.

Maier, L.S. (2005). CaMKII δ overexpression in hypertrophy and heart failure: cellular consequences for excitation-contraction coupling. *Braz J Med Biol Res* 38, 1293-1302.

Maruyama, K. (1997). Connectin/titin, giant elastic protein of muscle. *Faseb J* 11, 341-345.

Mery, P.F., Lohmann, S.M., Walter, U., und Fischmeister, R. (1991). Ca²⁺ current is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian cardiac myocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 1197-1201.

Molkentin, J.D. (2000). Calcineurin and beyond: cardiac hypertrophic signaling. *Circulation research* 87, 731-738.

Mongillo, M., Tocchetti, C.G., Terrin, A., Lissandron, V., Cheung, Y.F., Dostmann, W.R., Pozzan, T., Kass, D.A., Paolocci, N., Houslay, M.D., *et al.* (2006). Compartmentalized phosphodiesterase-2 activity blunts beta-adrenergic cardiac inotropy via an NO/cGMP-dependent pathway. *Circulation research* 98, 226-234.

Muirhead, G.J., Rance, D.J., Walker, D.K., und Wastall, P. (2002). Comparative human pharmacokinetics and metabolism of single-dose oral and intravenous sildenafil. *British journal of clinical pharmacology* 53 *Suppl 1*, 13S-20S.

Mukoyama, M., Nakao, K., Saito, Y., Ogawa, Y., Hosoda, K., Suga, S., Shirakami, G., Jougasaki, M., und Imura, H. (1990). Increased human brain natriuretic peptide in congestive heart failure. *The New England journal of medicine* 323, 757-758.

Muramatsu, M., Tyler, R.C., Gutkowska, J., Klinger, J.R., Hill, N.S., Rodman, D.M., und McMurtry, I.F. (1997). Atrial natriuretic peptide accounts for increased cGMP in hypoxia-induced hypertensive rat lungs. *The American journal of physiology* 272, L1126-1132.

Muslin, A.J. (2008). MAPK signalling in cardiovascular health and disease: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Clin Sci (Lond)* 115, 203-218.

Nagayama, T., Hsu, S., Zhang, M., Koitabashi, N., Bedja, D., Gabrielson, K.L., Takimoto, E., und Kass, D.A. (2009). Pressure-overload magnitude-dependence of the anti-hypertrophic efficacy of PDE5A inhibition. *Journal of molecular and cellular cardiology* 46, 560-567.

Nagendran, J., Archer, S.L., Soliman, D., Gurtu, V., Moudgil, R., Haromy, A., St Aubin, C., Webster, L., Rebeyka, I.M., Ross, D.B., *et al.* (2007). Phosphodiesterase type 5 is highly expressed in the hypertrophied human right ventricle, and acute inhibition of phosphodiesterase type 5 improves contractility. *Circulation* 116, 238-248.

Ockaili, R., Salloum, F., Hawkins, J., und Kukreja, R.C. (2002). Sildenafil (Viagra) induces powerful cardioprotective effect via opening of mitochondrial K(ATP) channels in rabbits. *American journal of physiology* 283, H1263-1269.

Oliver, J.J., Melville, V.P., und Webb, D.J. (2006). Effect of regular phosphodiesterase type 5 inhibition in hypertension. *Hypertension* 48, 622-627.

Oliver, P.M., Fox, J.E., Kim, R., Rockman, H.A., Kim, H.S., Reddick, R.L., Pandey, K.N., Milgram, S.L., Smithies, O., und Maeda, N. (1997). Hypertension, cardiac hypertrophy, and sudden death in mice lacking natriuretic peptide receptor A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 14730-14735.

Omori, K., und Kotera, J. (2007). Overview of PDEs and their regulation. *Circulation research* 100, 309-327.

Pandey, K.N., Nguyen, H.T., Li, M., und Boyle, J.W. (2000). Natriuretic peptide receptor-A negatively regulates mitogen-activated protein kinase and proliferation of mesangial cells: role of cGMP-dependent protein kinase. *Biochemical and biophysical research communications* 271, 374-379.

Pertovaara, A., Haapalinna, A., Sirvio, J., und Virtanen, R. (2005). Pharmacological properties, central nervous system effects, and potential therapeutic applications of atipamezole, a selective alpha2-adrenoceptor antagonist. *CNS drug reviews* 11, 273-288.

Pierkes, M., Gambaryan, S., Boknik, P., Lohmann, S.M., Schmitz, W., Potthast, R., Holtwick, R., und Kuhn, M. (2002). Increased effects of C-type natriuretic peptide on cardiac ventricular contractility and relaxation in guanylyl cyclase A-deficient mice. *Cardiovascular research* 53, 852-861.

Piggott, L.A., Hassell, K.A., Berkova, Z., Morris, A.P., Silberbach, M., und Rich, T.C. (2006). Natriuretic peptides and nitric oxide stimulate cGMP synthesis in different cellular compartments. *J Gen Physiol* 128, 3-14.

Potter, L.R., Abbey-Hosch, S., und Dickey, D.M. (2006). Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev* 27, 47-72.

Prins, B.A., Weber, M.J., Hu, R.M., Pedram, A., Daniels, M., und Levin, E.R. (1996). Atrial natriuretic peptide inhibits mitogen-activated protein kinase through the clearance receptor. Potential role in the inhibition of astrocyte proliferation. *The Journal of biological chemistry* 271, 14156-14162.

Ritter, O., und Neyses, L. (2003). The molecular basis of myocardial hypertrophy and heart failure. *Trends Mol Med* 9, 313-321.

Rockman, H.A., Ross, R.S., Harris, A.N., Knowlton, K.U., Steinhilber, M.E., Field, L.J., Ross, J., Jr., and Chien, K.R. (1991). Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 8277-8281.

Ruiz, M.L., London, B., and Nadal-Ginard, B. (1996). Cloning and characterization of an olfactory cyclic nucleotide-gated channel expressed in mouse heart. *Journal of molecular and cellular cardiology* 28, 1453-1461.

Ruwhof, C., and van der Laarse, A. (2000). Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways. *Cardiovascular research* 47, 23-37.

Sabrane, K., Gambaryan, S., Brandes, R.P., Holtwick, R., Voss, M., and Kuhn, M. (2003). Increased sensitivity to endothelial nitric oxide (NO) contributes to arterial normotension in mice with vascular smooth muscle-selective deletion of the atrial natriuretic peptide (ANP) receptor. *The Journal of biological chemistry* 278, 17963-17968.

Sabrane, K., Kruse, M.N., Fabritz, L., Zetsche, B., Mitko, D., Skryabin, B.V., Zwiener, M., Baba, H.A., Yanagisawa, M., and Kuhn, M. (2005). Vascular endothelium is critically involved in the hypotensive and hypovolemic actions of atrial natriuretic peptide. *The Journal of clinical investigation* 115, 1666-1674.

Schaefer, S., Ellinghaus, P., Janssen, W., Kramer, F., Lustig, K., Milting, H., Kast, R., and Klein, M. (2009). Chronic inhibition of phosphodiesterase 5 does not prevent pressure-overload-induced right-ventricular remodelling. *Cardiovascular research* 82, 30-39.

Senzaki, H., Smith, C.J., Juang, G.J., Isoda, T., Mayer, S.P., Ohler, A., Paolocci, N., Tomaselli, G.F., Hare, J.M., and Kass, D.A. (2001). Cardiac phosphodiesterase 5 (cGMP-specific) modulates beta-adrenergic signaling in vivo and is down-regulated in heart failure. *Faseb J* 15, 1718-1726.

Shah, A.M. (2005). Divergent roles of endothelial nitric oxide synthase in cardiac hypertrophy and chamber dilatation? *Cardiovascular research* 66, 421-422.

Sharif-Naeini, R., Folgering, J.H., Bichet, D., Duprat, F., Delmas, P., Patel, A., and Honore, E. (2009). Sensing pressure in the cardiovascular system: Gq-coupled mechanoreceptors and TRP channels. *Journal of molecular and cellular cardiology*.

Shesely, E.G., Maeda, N., Kim, H.S., Desai, K.M., Krege, J.H., Laubach, V.E., Sherman, P.A., Sessa, W.C., and Smithies, O. (1996). Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 13176-13181.

Shinlapawittayatorn, K., Chattipakorn, S., and Chattipakorn, N. (2005). Effect of sildenafil citrate on the cardiovascular system. *Braz J Med Biol Res* 38, 1303-1311.

Soboloff, J., Spassova, M., Xu, W., He, L.P., Cuesta, N., und Gill, D.L. (2005). Role of endogenous TRPC6 channels in Ca²⁺ signal generation in A7r5 smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry* 280, 39786-39794.

Solaro, R.J., Rosevear, P., und Kobayashi, T. (2008). The unique functions of cardiac troponin I in the control of cardiac muscle contraction and relaxation. *Biochemical and biophysical research communications* 369, 82-87.

Steiner, A.L., Parker, C.W., und Kipnis, D.M. (1972). Radioimmunoassay for cyclic nucleotides. I. Preparation of antibodies and iodinated cyclic nucleotides. *The Journal of biological chemistry* 247, 1106-1113.

Surapisitchat, J., Jeon, K.I., Yan, C., und Beavo, J.A. (2007). Differential regulation of endothelial cell permeability by cGMP via phosphodiesterases 2 and 3. *Circulation research* 101, 811-818.

Swiderek, K., Jaquet, K., Meyer, H.E., Schachtele, C., Hofmann, F., und Heilmeyer, L.M., Jr. (1990). Sites phosphorylated in bovine cardiac troponin T and I. Characterization by ³¹P-NMR spectroscopy and phosphorylation by protein kinases. *European journal of biochemistry / FEBS* 190, 575-582.

Takimoto, E., Belardi, D., Tocchetti, C.G., Vahebi, S., Cormaci, G., Ketner, E.A., Moens, A.L., Champion, H.C., und Kass, D.A. (2007). Compartmentalization of cardiac beta-adrenergic inotropy modulation by phosphodiesterase type 5. *Circulation* 115, 2159-2167.

Takimoto, E., Champion, H.C., Belardi, D., Moslehi, J., Mongillo, M., Mergia, E., Montrose, D.C., Isoda, T., Aufiero, K., Zaccolo, M., *et al.* (2005a). cGMP catabolism by phosphodiesterase 5A regulates cardiac adrenergic stimulation by NOS3-dependent mechanism. *Circulation research* 96, 100-109.

Takimoto, E., Champion, H.C., Li, M., Belardi, D., Ren, S., Rodriguez, E.R., Bedja, D., Gabrielson, K.L., Wang, Y., und Kass, D.A. (2005b). Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy. *Nat Med* 11, 214-222.

Takimoto, E., Koitabashi, N., Hsu, S., Ketner, E.A., Zhang, M., Nagayama, T., Bedja, D., Gabrielson, K.L., Blanton, R., Siderovski, D.P., *et al.* (2009). Regulator of G protein signaling 2 mediates cardiac compensation to pressure overload and antihypertrophic effects of PDE5 inhibition in mice. *The Journal of clinical investigation* 119, 408-420.

Thomas L., H. (1998). *Labor und Diagnose (Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik)*, 5. Auflage (Frankfurt a.Main, TH-Books-Verlags-Gesellschaft).

Urbaszek W., E.H., Modersohn D. (Hrsg.) (1992). *Kardiovaskuläre Funktionsdiagnostik* (Jena, Gustav Fischer Verlag).

- van Heerebeek, L., Borbely, A., Niessen, H.W., Bronzwaer, J.G., van der Velden, J., Stienen, G.J., Linke, W.A., Laarman, G.J., and Paulus, W.J. (2006). Myocardial structure and function differ in systolic and diastolic heart failure. *Circulation* *113*, 1966-1973.
- Vellaichamy, E., Zhao, D., Somanna, N., and Pandey, K.N. (2007). Genetic disruption of guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor-A upregulates ACE and AT1 receptor gene expression and signaling: role in cardiac hypertrophy. *Physiological genomics* *31*, 193-202.
- Vila-Petroff, M.G., Younes, A., Egan, J., Lakatta, E.G., and Sollott, S.J. (1999). Activation of distinct cAMP-dependent and cGMP-dependent pathways by nitric oxide in cardiac myocytes. *Circulation research* *84*, 1020-1031.
- Walker, D.K., Ackland, M.J., James, G.C., Muirhead, G.J., Rance, D.J., Wastall, P., and Wright, P.A. (1999). Pharmacokinetics and metabolism of sildenafil in mouse, rat, rabbit, dog and man. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* *29*, 297-310.
- Watanabe, H., Murakami, M., Ohba, T., Ono, K., and Ito, H. (2009). The pathological role of transient receptor potential channels in heart disease. *Circ J* *73*, 419-427.
- Wegener, J.W., Nawrath, H., Wolfsgruber, W., Kuhbandner, S., Werner, C., Hofmann, F., and Feil, R. (2002). cGMP-dependent protein kinase I mediates the negative inotropic effect of cGMP in the murine myocardium. *Circulation research* *90*, 18-20.
- Welberg, L.A., Kinkead, B., Thirivikraman, K., Huerkamp, M.J., Nemeroff, C.B., and Plotsky, P.M. (2006). Ketamine-xylazine-acepromazine anesthesia and postoperative recovery in rats. *J Am Assoc Lab Anim Sci* *45*, 13-20.
- Wilkins, B.J., and Molkentin, J.D. (2002). Calcineurin and cardiac hypertrophy: where have we been? Where are we going? *The Journal of physiology* *541*, 1-8.
- Wollert, K.C., Fiedler, B., Gambaryan, S., Smolenski, A., Heineke, J., Butt, E., Trautwein, C., Lohmann, S.M., and Drexler, H. (2002). Gene transfer of cGMP-dependent protein kinase I enhances the antihypertrophic effects of nitric oxide in cardiomyocytes. *Hypertension* *39*, 87-92.
- Wollert, K.C., Yurukova, S., Kilic, A., Begrow, F., Fiedler, B., Gambaryan, S., Walter, U., Lohmann, S.M., and Kuhn, M. (2003). Increased effects of C-type natriuretic peptide on contractility and calcium regulation in murine hearts overexpressing cyclic GMP-dependent protein kinase I. *British journal of pharmacology* *140*, 1227-1236.
- Yamazaki, T., Komuro, I., and Yazaki, Y. (1998). Signalling pathways for cardiac hypertrophy. *Cell Signal* *10*, 693-698.

Yanaka, N., Kotera, J., Ohtsuka, A., Akatsuka, H., Imai, Y., Michibata, H., Fujishige, K., Kawai, E., Takebayashi, S., Okumura, K., *et al.* (1998). Expression, structure and chromosomal localization of the human cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase PDE5A gene. *European journal of biochemistry / FEBS* 255, 391-399.

Yang, L., Liu, G., Zakharov, S.I., Bellinger, A.M., Mongillo, M., und Marx, S.O. (2007). Protein kinase G phosphorylates Cav1.2 alpha1c and beta2 subunits. *Circulation research* 101, 465-474.

Yao, X., Leung, P.S., Kwan, H.Y., Wong, T.P., und Fong, M.W. (1999). Rod-type cyclic nucleotide-gated cation channel is expressed in vascular endothelium and vascular smooth muscle cells. *Cardiovascular research* 41, 282-290.

Yurukova, S., Kilic, A., Volker, K., Leineweber, K., Dybkova, N., Maier, L.S., Brodde, O.E., und Kuhn, M. (2007). CaMKII-mediated increased lusitropic responses to beta-adrenoreceptor stimulation in ANP-receptor deficient mice. *Cardiovascular research* 73, 678-688.

Zaccolo, M., und Movsesian, M.A. (2007). cAMP and cGMP signaling cross-talk: role of phosphodiesterases and implications for cardiac pathophysiology. *Circulation research* 100, 1569-1578.

Zhao, L., Mason, N.A., Morrell, N.W., Kojonazarov, B., Sadykov, A., Maripov, A., Mirrahimov, M.M., Aldashev, A., und Wilkins, M.R. (2001). Sildenafil inhibits hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 104, 424-428.

Zhao, L., Mason, N.A., Strange, J.W., Walker, H., und Wilkins, M.R. (2003). Beneficial effects of phosphodiesterase 5 inhibition in pulmonary hypertension are influenced by natriuretic Peptide activity. *Circulation* 107, 234-237.

Zhu, J., und McKeon, F. (1999). NF-AT activation requires suppression of Crm1-dependent export by calcineurin. *Nature* 398, 256-260.

Zobel, C., Rana, O.R., Saygili, E., Bolck, B., Saygili, E., Diedrichs, H., Reuter, H., Frank, K., Muller-Ehmsen, J., Pfitzer, G., *et al.* (2007). Mechanisms of Ca²⁺-dependent calcineurin activation in mechanical stretch-induced hypertrophy. *Cardiology* 107, 281-290.

Danksagung

Ich danke Frau Professor Dr. med. Kuhn für die Überlassung des Themas, für die allzeit gewährte freundliche Unterstützung und die ständige fachliche Betreuung. Des Weiteren danke ich Frau Professor Dr. med. Kuhn, dass Sie mir die Möglichkeit geboten hat, diese Dissertation auf einem internationalen Kongress im Rahmen einer Posterpräsentation - mit viel Rückendeckung von ihr und Herrn Dr. med. Martin van Eickels - vorzustellen.

Herrn Dr. med. Martin van Eickels möchte ich für die Durchführung der Transversen Aortenkonstriktion und die Hilfe beim Erstellen des Posters und der Dissertation danken. Ebenfalls möchte ich mich bei Priv.-Doz. Dr. med. Stefan Frantz und Frau Barbara Bayer für die Anfertigung der echokardiographischen Aufnahmen sowie die Hilfe bei der Auswertung bedanken. Ich danke Herrn Professor Dr. med. Baba und seinen Mitarbeiterinnen für die Anfertigung der Präparate zum Vermessen des Kollagenfasergehaltes und des Kardiomyozytendurchmessers.

Ich danke Frau Katharina Völker für die Einarbeitung in diverse Labortechniken, für Ihre hilfsbereite Art und ihr ständig offenes Ohr für technische und auch andere Probleme. Frau Birgit Gassner danke ich für die vielen Tipps zum Arbeiten im Labor und die Unterstützung beim Radioimmunoassay. Ebenso darf ich Frau Alexandra Gazinski für die Hilfe bei den Radioimmunoassays sowie beim Homogenisieren von Gewebeproben danken.

Von Frau Barabara Schreier erhielt ich wertvolle Tipps beim Erstellen meines Posters, beim Mikroskopieren und vielem mehr. Ich danke Frau Bärbel Zumkeller für die vielen Kleinigkeiten und Gefallen, die sie mir stets abgenommen hat. Herrn Professor Dr. med. Silbernagl danke ich für die vielen Tassen Espresso, mit denen er meine Laborpausen versüßt hat. Ebenfalls möchte ich Frau Wibke Rohlfs für die statistische Beratung danken.

Ich danke meinen Eltern, dass sie mich während meiner gesamten Studienzeit bei allem unterstützt haben, und mir einen Glauben an meine Fähigkeiten vermittelt haben.

Ich danke Herrn Sebastian Thoma für seine endlose Geduld und die Unterstützung.

Ich danke allen meinen Freunden, die mich auf dem Weg zur Fertigstellung dieser Dissertation begleitet haben.

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE ANGABEN

Name	Elisabeth Christiane Eder
Geburtsdatum	31.12.1983
Geburtsort	München
Familienstand	ledig

SCHULAU SBILDUNG

1990-1994	Maria-Ward-Grundschule, München
1994-2003	Bertolt-Brecht-Gymnasium, München
Mai 2003	Abitur

STUDIUM

Oktober 2003 -März 2004	Studium Medizin-Management, Universität Duisburg-Essen
seit April 2004	Studium der Humanmedizin, Julius-Maximilians-Universität Würzburg
März 2006	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
August-Dezember 2009	PJ-Tertial in der Inneren Medizin des Juliusspitals Würzburg
Dezember 2009-März 2010	PJ-Tertial in der Chirurgischen Klinik des Juliusspitals Würzburg
März 2010-Juli 2010	PJ-Tertial in der Anästhesiologischen Abteilung des Juliusspitals Würzburg
November 2010	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

PRAKTIKA UND FAMULATUREN

Juli-September 2004	Pflegepraktikum in der Chirurgischen Abteilung des Elisabeth-Krankenhaus Essen
Februar-März 2005	Pflegepraktikum in der Neurologischen Abteilung des Klinikums Großhadern München
August-September 2006	Famulatur in der Transplantationschirurgie / Urologie des Klinikums Großhadern München
März 2008	Famulatur in der Inneren Medizin des Klinikums Dritter Orden in München
August 2008	Famulatur in der Notaufnahme des Singapore General Hospital
Februar 2009	Famulatur in der Anästhesiologischen Abteilung der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Murnau
März-April 2009	Famulatur in der Urologischen Abteilung des Missionsärztlichen Krankenhauses in Würzburg

KENNTNISSE UND INTERESSEN

Sprachen	Gute Englischkenntnisse in Schrift und Wort
EDV	Gute Anwenderkenntnisse in Microsoft Word, Power Point, Microsoft Excel, sowie Kenntnisse in SPSS
Interessen	Musik (Klavier, Chor) Reisen Schwimmen und Wintersport