

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl

**Einfluss einer Kombinationstherapie aus dem ACE-Hemmer Ramipril und dem
Aktivator der löslichen Guanylatzyklase Ataciguat auf das kardiale Remodeling
nach experimentellem Myokardinfarkt**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Stephanie Motschenbacher

aus Bad Kissingen

Würzburg, August 2011

Referent: Prof. Dr. Johann Bauersachs

Korreferent: Prof. Dr. Kai Schuh

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 07. Dezember 2012

Die Promovendin ist Ärztin

Meinen lieben Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Kardiales Remodeling nach Myokardinfarkt.....	1
1.2	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) und kardiales Remodeling.....	3
1.3	Die Rolle von Stickstoffmonoxid (NO) im kardiovaskulären System	5
1.4	Ataciguat-Natrium (HMR1766) als NO-unabhängiger Aktivator der löslichen Guanylatzyklase (sGC).....	7
2	Material und Methoden	9
2.1	Studiendesign.....	9
2.1.1	Versuchstiere	9
2.1.2	Infarzierung.....	9
2.1.3	Einteilung in Versuchsgruppen und Therapie	10
2.2	Hämodynamische Messungen.....	11
2.3	Probenentnahme und Infarktgrößenbestimmung	12
2.4	Probenaufbereitung.....	13
2.5	Myozytengrößenbestimmung	14
2.6	Bestimmung des Kollagengehalts im überlebenden Myokard.....	15
2.7	Biochemische Messungen	16
2.7.1	Messung der myokardialen und mitochondrialen Superoxidanionenproduktion	16
2.7.2	Western Blot.....	19
2.8	Microarray-Analyse.....	21
2.9	Statistische Auswertung	21

3	Ergebnisse.....	22
3.1	Globalparameter der Versuchstiere	22
3.1.1	Körpergewicht, Infarktgröße und Ventrikelmorphologie	22
3.1.2	Lungenflüssigkeit	23
3.2	Ergebnisse der hämodynamischen Messungen	24
3.2.1	Druckverhältnisse im linken Ventrikel.....	24
3.2.2	Auswurfleistung des linken Ventrikels	26
3.2.3	Kontraktilitätsindizes	27
3.3	Ergebnisse der Myozytengrößenbestimmung.....	29
3.4	Interstitielle Fibrose (Kollagenanteil im überlebenden Myokard des linken Ventrikels)	31
3.5	Superoxidanionen-Produktion.....	33
3.5.1	Kardiale Superoxidanionen-Produktion	33
3.5.2	Mitochondriale Superoxidanionen-Produktion	34
3.6	Ergebnisse der Microarray-Analyse.....	34
3.7	UCP3- und gp91phox-Expression.....	35
4	Diskussion	37
4.1	Effekte von Ataciguat und Ramipril auf Hämodynamik, Ventrikelmorphologie, Hypertrophie und Fibrose.....	38
4.2	Additive Effekte der Kombinationstherapie	39
4.3	Oxidativer Stress als aggravierender Faktor bei ventrikulärem Remodeling nach Myokardinfarkt	42
5	Zusammenfassung.....	50
6	Literaturverzeichnis	51

1 Einleitung

Das Syndrom der chronischen Herzinsuffizienz stellt eines der häufigsten internistischen Behandlungsanlässe dar. 1-2% der Bevölkerung in den Industrieländern leiden daran, bei den Über-70-Jährigen steigt die Prävalenz sogar auf mehr als 10%, während im Alter von 45-55 Jahren noch weniger als 1% betroffen sind [1]. Dies bedeutet, dass in einer zunehmend älter werdenden Gesellschaft mit weiterhin steigenden Fallzahlen zu rechnen ist. Zusätzlich ist die Prognose von erkrankten Patienten äußerst ungünstig. In der *Framingham*-Studie beispielsweise waren nur 25% der Männer und 38% der Frauen fünf Jahre nach Diagnosestellung noch am Leben [2] und auch heute, über ein Jahrzehnt später, ist die Prognose mit einer jährlichen Mortalitätsrate von 10% noch immer nicht besser als bei vielen malignen Neoplasien [3], obwohl bereits große Fortschritte in Management und Therapie der Herzinsuffizienz gemacht wurden [4].

1.1 Kardiales Remodeling nach Myokardinfarkt

Eine der häufigsten Ursachen, die in den westlichen Ländern zur Herzinsuffizienz führen, ist der akute Myokardinfarkt [5]. Unter diesen pathophysiologischen Bedingungen kommt es zu komplexen Umbauprozessen an Herz und Gefäßen sowohl auf genexpressorischer, als auch auf molekularer, zellulärer und interstitieller Ebene. Die Gesamtheit dieser Umbauvorgänge am Herzen wird unter dem Begriff kardiales Remodeling zusammengefasst [6, 7] und bringt neben mechanischen und hämodynamischen Veränderungen auch die Aktivierung verschiedener neurohormonaler Systeme mit sich [8]. Die Veränderungen, zu denen es an den Gefäßen kommt, betreffen dabei nicht nur die glatte Muskulatur, sondern vor allem auch das Endothel. Man spricht von endothelialer Dysfunktion [3]. Abbildung 1.1 zeigt die Pathophysiologie des linksventrikulären Remodelings nach Myokardinfarkt.

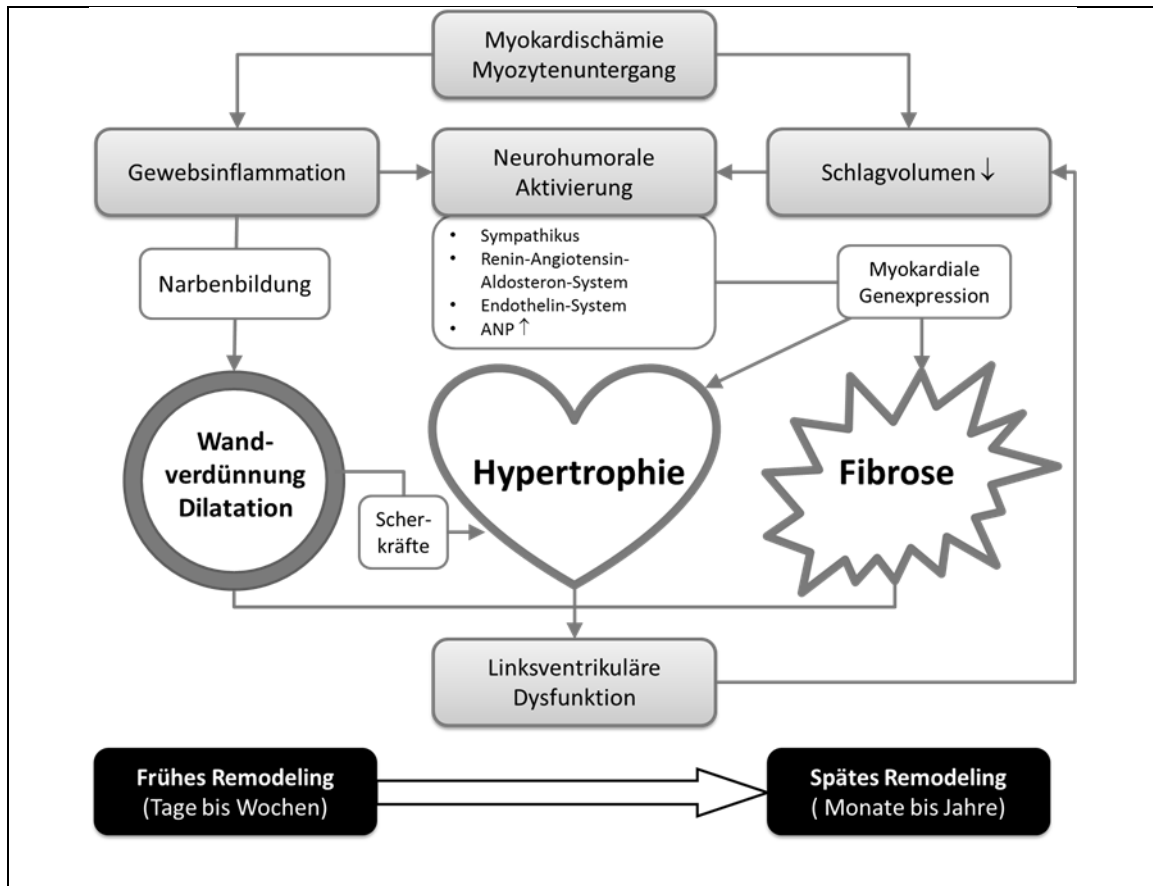


Abbildung 1.1: Übersicht über die Vorgänge in der frühen und späten Phase nach Myokardinfarkt. Durch die Myokardschädigung kommt es zum Absinken des Schlagvolumens und zur Gewebsinflammation, was in den ersten Tagen nach Myokardinfarkt eine Narbenbildung und Ventrikeldilatation zur Folge hat. Die Aktivierung verschiedener neurohormonaler Systeme führt über Veränderungen in der Genexpression langfristig zur Fibrose, Hypertrophie und Dilatation des linken Ventrikels, auch in den gesunden Bereichen des Myokards.

In der frühen Phase nach Myokardinfarkt kommt es zur Nekrose des ischämischen Myokards mit Einwandern von Entzündungszellen wie Makrophagen und neutrophilen Granulozyten sowie zur Narbenbildung im Infarktgebiet. Innerhalb von Tagen bis Wochen kann es im Rahmen von Heilungs- und Anpassungsprozessen [9] zur Ausdehnung des Infarktgebiets auf nicht unmittelbar vom Infarkt betroffenes Myokard mit Wandverdünnung und Dilatation des Ventrikels kommen, was zu gefürchteten Komplikationen in der frühen Phase nach Myokardinfarkt führen kann, wie z.B. Ventrikelruptur oder Aneurysmabildung [10]. Die sich anschließende Phase, das „Late Remodeling“, erstreckt sich über Monate und ist vor allem gekennzeichnet durch zunehmende sphärische Verformung, Fibrose und Hypertrophie des gesamten Ventrikels über die Infarktzone hinaus [7]. Mehrere Faktoren spielen hierbei eine Rolle. Durch die akute Myokardischämie kommt es zum Verlust von sich kontrahierendem

Gewebe und damit zum Pumpversagen des Herzens. Um die Systemperfusion zunächst aufrecht zu erhalten, kommt es zur Aktivierung verschiedener neurohumoraler Systeme. Hierzu gehört die Hochregulation des Sympathikotonus, eine verstärkte Natrium- und Wasserretention sowie die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). Über Aktivierung verschiedener Wachstumsfaktoren und verstärkte Proteinsynthese kommt es schließlich zur Myozytenhypertrophie, die einen Zellvolumenzuwachs von bis zu 70% zur Folge haben kann, sowie zur verstärkten Kollagensynthese mit Fibrosierung des kardialen Interstitiums [11] und Ventrikeldilatation. Diese kann als nichtinvasives Maß des linksventrikulären Remodelings angesehen werden und ist auch bei Patienten, die nach Herzinfarkt asymptomatisch blieben, mit der Entwicklung einer chronischen Herzinsuffizienz und vorzeitigem plötzlichen Herztod verbunden [12]. Daher ist das kardiale Remodeling von größter klinischer und therapeutischer Bedeutung.

1.2 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) und kardiales Remodeling

Registrieren die renalen Barosensoren am juxtaglomerulären Apparat einen Blutdruckabfall, wie es etwa durch die linksventrikuläre Dysfunktion nach Myokardinfarkt der Fall ist, kommt es reaktiv zur Erhöhung der Plasma-Renin-Konzentration und damit zur Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (Abbildung 1.2). Das von Renin zu Angiotensin I gespaltene Angiotensinogen aus der Leber wird durch das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) zu Angiotensin II umgewandelt, welches ein starker natürlicher Vasokonstriktor ist und damit blutdrucksteigernd wirkt. Des Weiteren inaktiviert ACE den Vasodilatator Bradykinin.

ACE-Hemmer wie Ramipril inhibieren das Angiotensin-Converting-Enzym. Lange Zeit vermutete man daher, die positiven Effekte der ACE-Hemmer seien hauptsächlich darin begründet, dass die Blockade des RAAS zur Senkung des peripheren

Gefäßwiderstandes und damit zur Entlastung des Herzens durch Verringerung der Vor- und Nachlast führt.

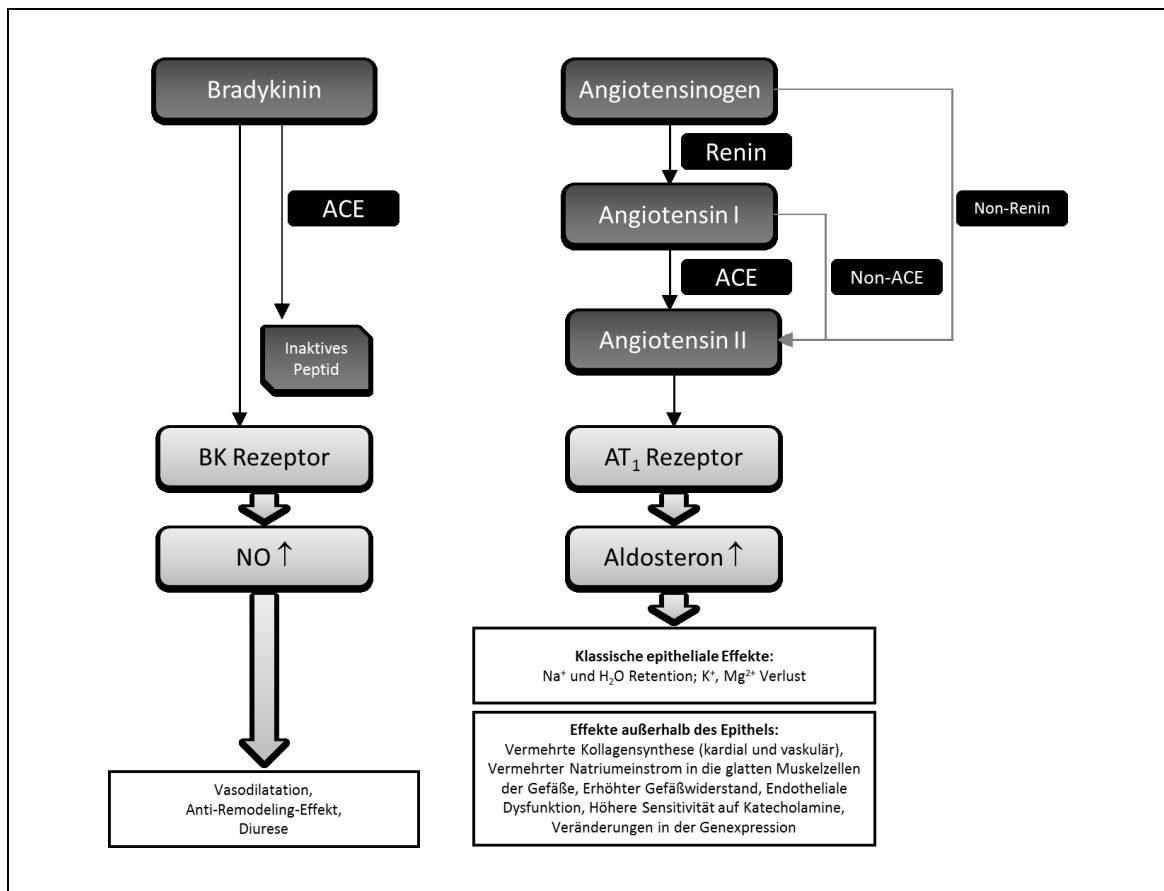


Abbildung 1.2: Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System. Bei Blutdruckabfall kommt es im juxtaglomerulären Apparat in der Niere zur vermehrten Ausschüttung von Renin. Dieses spaltet Angiotensinogen zu Angiotensin I. Das Angiotensin-Converting-Enzym bildet aus Angiotensin I das vielfältig wirksame Angiotensin II. Alternativ können auch Chymasen aus Mastzellen diese Reaktion katalysieren (Non-ACE). Zudem besitzt ACE die Fähigkeit, den Vasodilatator Bradykinin in ein inaktives Peptid zu spalten, was indirekt zur Minderung der NO-Bioverfügbarkeit führt. Angiotensin II wirkt an verschiedenen Rezeptoren, am besten bekannt ist bisher der AT₁-Rezeptor, über den auch die Ausschüttung von Aldosteron angeregt wird. Sowohl Angiotensin II, als auch Aldosteron und Bradykinin bzw. NO vermitteln zahlreiche kompensatorische Effekte nach Myokardinfarkt, die in den Boxen am unteren Bildrand gezeigt werden. Nach Zaman et al. [13].

Es hat sich aber in verschiedenen Studien gezeigt, dass dies nur einen geringen Teil der Wirkweise der ACE-Hemmer ausmacht. Zudem ist mittlerweile bekannt, dass ACE nicht nur im Plasma, sondern vor allem auch im Endothel aller Blutgefäße und in Kardiomyozyten vorkommt [14] und mit seinen dort erzielten Effekten zum linksventrikulären Remodeling nach Myokardinfarkt beiträgt. Eine zentrale Rolle spielt dabei das Angiotensin II. Es ist mitogen bzw. verstärkt die Proteinsynthese in Myofibroblasten und trägt damit maßgeblich zur kardialen Fibrose bei. Zudem ist es

einer der wichtigsten Stimulationsfaktoren zur Ausbildung der Myozytenhypertrophie: Es wird bei zunehmendem kardialen Wandstress ausgeschüttet, weil es zur Permeabilitätssteigerung der Koronararterien führt und dadurch Wachstumsfaktoren leichter ins myokardiale Interstitium übertreten können, stimuliert aber auch direkt die Ausschüttung von Proliferationsfaktoren [6, 7, 14-17]. Auch die endotheliale Funktion sowohl von kardialen als auch von peripheren Gefäßen wird durch Angiotensin-II-stimulierte Superoxidanionenbildung (siehe unten) beeinträchtigt [18]. Verschiedene Studien haben ergeben, dass unter ACE-Hemmung das Remodeling und die Dilatation des linken Ventrikels verhindert werden [19]. Greenberg B. et al. veröffentlichten 1995 mit der SOLVD-Studie (*Studies of Left Ventricular Dysfunction*) Ergebnisse, dass Enalapril bei Patienten mit linksventrikulärer Dysfunktion im Verlauf sogar zur Rückbildung von Hypertrophie und Dilatation geführt hat [20], was auch als „reverse-remodeling“ bezeichnet wird [8]. Aufgrund der Komplexität der Vorgänge beim kardialen Remodeling und der bereits erwähnten, weiterhin hohen Mortalität durch linksventrikuläre Dysfunktion nach Myokardinfarkt reicht eine alleinige Therapie mit ACE-Hemmern jedoch nicht aus.

1.3 Die Rolle von Stickstoffmonoxid (NO) im kardiovaskulären System

Lange war die Existenz von Stickstoffmonoxid (NO) im kardiovaskulären System unbekannt. Erst in den letzten Jahrzehnten gewann man Aufschluss über dessen weitreichende Bedeutung. Robert Furchgott, Ferid Murad und Louis Ignarro erhielten dafür 1998 den Nobelpreis für Medizin.

Stickstoffmonoxid wird von verschiedenen NO-Synthasen im Gefäßendothel und im sarkoplasmatischen Retikulum des Myokards produziert, von denen die konstitutiv exprimierte endotheliale NO-Synthase, die zusätzlich auch im Sarkolemm der Kardiomyozyten lokalisiert ist, eine kardioprotektive Rolle im Rahmen des Remodelings einnimmt [21]. So wurde kürzlich gezeigt, dass eine Langzeitbehandlung mit dem

eNOS-Verstärker AVE9488 nach Myokardinfarkt sowohl das linksventrikuläre Remodeling als auch eine kontraktile Dysfunktion verhindern kann [22, 23]. Die im Zytosol vorliegende induzierbare NOS (iNOS) dagegen wird erst durch inflammatorische Zytokine aktiviert und konnte in bisherigen Studien noch keine eindeutigen Ergebnisse zur Wirkung auf das Remodeling liefern [24]. Welche Rolle spielt NO nun genau im kardiovaskulären System? NO wird von den Endothelzellen der Gefäße und von Kardiomyozyten gebildet. Unter physiologischen Bedingungen reguliert NO als natürlicher Vasodilatator den Gefäßtonus und die Myozytenkontraktilität. Zudem schützt es die Herzmuskelzellen vor Apoptose und Hypertrophie [25] und hat einen antiinflammatorischen Effekt. Auf Thrombozyten wirkt es aggregationshemmend [26]. Diese Effekte werden mit Hilfe der löslichen Guanylatzyklase („soluble guanylate cyclase“, sGC), als NO-Sensor vermittelt. Die Bindungsdomäne der sGC enthält ein Häm-Molekül, das in zwei Redoxformen vorliegen kann. Die reduzierte Form enthält zweiwertiges Eisen (Fe(II)), ist NO-sensitiv und kann daher mit diesem reagieren. Es kommt zur Aktivierung der sGC und damit zur Bildung des „second messengers“ cGMP, der die Signalwege für die verschiedenen eben genannten protektiven Effekte vermittelt. Unter pathologischen Bedingungen, etwa durch oxidativen Stress, wird das Eisenion im Häm-Molekül zu dreiwertigem Eisen (Fe(III)) oxidiert, die sGC ist nicht mehr NO-sensitiv und die positiven Effekte können nicht mehr vermittelt werden [26]. Oxidativer Stress beschreibt das Missverhältnis zwischen protektiv wirkenden Antioxidantien und hochreaktiven Sauerstoffgruppen (reactive oxygen species, ROS) im Gewebe [27]. Hierzu gehören z.B. Superoxidanionen (O_2^-), die im Zusammenhang mit linksventrikulärem Remodeling nach Herzinfarkt in erhöhter Konzentration im Myokard gemessen werden können [28].

Die bisher eingesetzten Therapeutika führten immer zu einer direkten Erhöhung der NO-Bioverfügbarkeit bzw. dadurch zur NO-abhängigen Stimulation der sGC. Nitrate setzen direkt NO frei, was langfristig zur NO-Toleranz führt und unkontrollierbare Reaktionen von NO mit sich bringt [29]. Auch ACE-Hemmer führen über die Hemmung des Bradykinin-Abbaus und der Angiotensin-II-Bildung zur Erhöhung der NO-

Bioverfügbarkeit (siehe Abbildung 1.2) und AVE9488 verstärkt direkt die eNOS. In allen Fällen ist aber aufgrund der verstärkten Superoxidanionen-Produktion nach Myokardinfarkt und bei Herzinsuffizienz mit einer Limitation des therapeutischen Nutzens zu rechnen, da eine zunehmende NO-Produktion auch zu zunehmender Peroxynitrit-Entstehung, eNOS-Entkopplung und sGC-Oxidation führt [26, 27, 30].

1.4 Ataciguat-Natrium (HMR1766) als NO-unabhängiger Aktivator der löslichen Guanylatzyklase (sGC)

1994 wurden erstmals Substanzen entdeckt, die es ermöglichen, dass die sGC unabhängig von NO, aber Häm-abhängig, cGMP synthetisiert. Diese sogenannten „sGC-Stimulatoren“, wie z.B. das zuerst entdeckte Indazol-Derivat YC-1 [31] sind allerdings auch wirkungslos, sobald die lösliche Guanylatzyklase durch Reaktion mit hochreaktiven Sauerstoffgruppen in oxidierte Form vorliegt [26]. Schindler et al. charakterisierten daraufhin 2006 eine neue Substanzklasse der „sGC-Aktivatoren“, die auch in der Lage ist, die NO-insensitive, oxidierte Form der sGC unabhängig von NO und Häm zu aktivieren und die sogar bevorzugt mit dieser Redox-Form reagiert [32]. Einer dieser Häm-unabhängigen sGC-Aktivatoren ist das Anthranilsäure-Derivat HMR1766, neu bezeichnet als Ataciguat(-Natrium) (siehe Abbildung 1.3). Ataciguat ist also auch unter den Gegebenheiten des oxidativen Stresses aktiv, wo andere Substanzen oder auch NO selbst aufgrund der sGC-Dysfunktion ineffektiv sind [33].

Bisherige Studien zeigten, dass eine Therapie mit Ataciguat bei Ratten mit Diabetes die Gefäßfunktionalität verbesserte und durch Verhinderung einer übermäßigen Plättchenaggregation zur Abwendung von nachteiligen kardiovaskulären Ereignissen beitragen konnte [34]. Auch bei Untersuchungen mit herzinsuffizienten Ratten zeigten sich diese positiven Effekte auf die endotheliale Funktion [35]. Nun stellt sich die Frage, ob Ataciguat nicht nur auf die endotheliale Funktion, sondern auch auf das kardiale Remodeling nach Myokardinfarkt Einfluss nehmen kann.

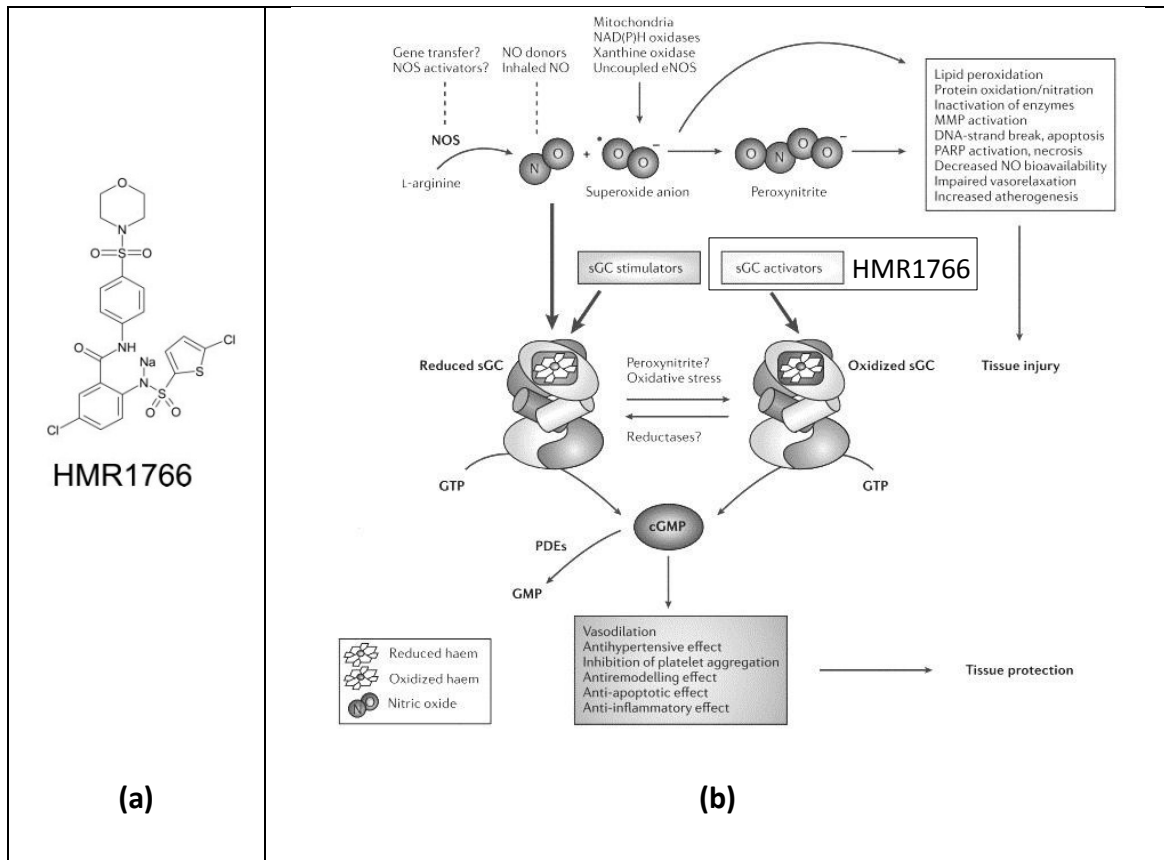


Abbildung 1.3: (a) Strukturformel von HMR1766. Nach Schindler et al. [32]. (b) Zusammenhänge zwischen NO-sGC-cGMP-Signaltransduktionsweg, Peroxynitritbildung, sGC-Inaktivierung und sGC-Stimulatoren bzw. Aktivatoren (HMR1766). PDE = Phosphodiesterase. Nach Evgenov et al. [26].

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Wirkung einer Langzeitbehandlung (9 Wochen) mit Ataciguat-Natrium (vormals HMR1766) alleine und in Kombination mit dem ACE-Hemmer Ramipril auf Hämodynamik und linksventrikuläres Remodeling in der Postinfarktphase bei Ratten untersucht. Die Therapie begann 10 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt, um speziell Aussagen über den Effekt auf das späte Remodeling treffen zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

2.1.1 Versuchstiere

Die hier behandelte Studie wurde mit erwachsenen, männlichen Wistar-Ratten (*Wistar Rat; Charles River, Deutschland*) durchgeführt, deren Gewicht zum Zeitpunkt der Infarzierung zwischen 200 g und 250 g betrug. Die Tiere wurden in Kunststoffkäfigen untergebracht und waren in einem klimatisierten Tierstall mit konstanten Umweltbedingungen einem zwölfstündigen Tag-Nacht-Zyklus unterworfen. Sie hatten stets freien Zugang zu Wasser und Futter.

2.1.2 Infarzierung

Der experimentell herbeigeführte Myokardinfarkt bei den Tieren erfolgte durch eine Ligatur des Ramus interventrikularis anterior (RIVA) der Arteria coronaria sinistra.

Nach Feststellung des Körpergewichts wurden die Tiere mit Isofluran narkotisiert und intubiert. Die kontrollierte Beatmung wurde mit einem speziellen Beatmungsgerät für Nagetiere (*Rodent Ventilator 7025; Ugo Basile, Italien*) sichergestellt. Die Beatmungsfrequenz betrug 90/min, das Atemzugvolumen 2,5 ml.

Nach Desinfektion der linken Thoraxhälfte erfolgte die Eröffnung der Haut mit einer Schere. Anschließend wurde die Pectoralmuskulatur durchtrennt und durch lockere Anlage einer Tabaksbeutelnaht bereits auf den späteren Wiederverschluss vorbereitet. Der Zugang zur Thoraxhöhle gelang durch Spreizung der Rippen mit Hilfe einer Klemme. Nach Eröffnung des Perikards wurde das Herz durch Fingerdruck auf die laterale Brustwand aus Perikard und Brustkorb herausluxiert und der RIVA dargestellt. An proximaler Stelle erfolgte nun die Ligatur durch Umstechen des RIVA mittels eines 5-0 Prolene Monofilfadens (*Ethicon, Deutschland*). Anschließend wurde das Herz in

den Thorax reponiert und dieser mit Hilfe der vorgelegten Tabaksbeutelnaht und Metallklammern für die Haut verschlossen.

Nach Beendigung des chirurgischen Eingriffs wurde die Isoflurannarkose eingestellt und stattdessen mit Carbogen, einem Gemisch aus 95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxid beatmet, bis nach etwa fünf bis zehn Minuten postoperativ die Spontanatmung der Tiere ausreichend war und die Extubation durchgeführt werden konnte. In den folgenden fünf Stunden wurden die Ratten beobachtet und bei Auftreten von Herz-Rhythmus-Störungen gegebenenfalls durch hochfrequente Herz-Druck-Massage reanimiert.

Zur Erstellung einer Kontrollgruppe mit gesundem Herzen wurden einige Tiere scheinoperiert (Sham). Dazu wurde die Ligatur nicht vervollständigt, sondern nur eine lose Fadenschlinge um den RIVA gelegt. Das übrige Procedere des Eingriffs war völlig gleich.

2.1.3 Einteilung in Versuchsgruppen und Therapie

10 Tage nach Myokardinfarkt (MI) wurden die überlebenden Tiere randomisiert in fünf verschiedene Behandlungsgruppen aufgeteilt (siehe Tabelle 2.1). Die Placebo-Behandlung erfolgte mit 5% Gummi Arabicum. Auch die scheinoperierten Sham-Tiere erhielten eine Placebo-Behandlung. Die übrigen drei Versuchsgruppen erhielten unterschiedliche medikamentöse Therapien. Der HMR-MI-Gruppe wurde aus pharmakokinetischen Gründen zweimal täglich morgens und abends der NO-unabhängige sGC-Aktivatoren Ataciguat (HMR1766) (*Sanofi-Aventis, Frankfurt am Main*) in einer Dosierung von 10 mg/kg KG verabreicht. Die R-MI-Gruppe erhielt 1mg/kg KG täglich vom ACE-Hemmer Ramipril (*Sanofi-Aventis, Frankfurt am Main*) und die HMR+R-MI-Gruppe eine Kombination aus Ataciguat und Ramipril am Morgen und zusätzlich eine HMR1766-Dosis am Abend. Alle Lösungen wurden am Morgen frisch bereitet und den Tieren mit Hilfe einer Sonde in den Ösophagus verabreicht. Die Behandlung erfolgte über 9 Wochen, wobei zu Beginn jeder neuen Woche eine Dosisanpassung durch Neubestimmung des Körpergewichts der Tiere durchgeführt wurde.

Schein-OP	Myokardinfarkt (MI)			
SHAM	PLA-MI	HMR-MI	R-MI	HMR+R-MI
Placebo	Placebo	Ataciguat(HMR1766)	Ramipril	Ataciguat + Ramipril
5 % Gummi Arabicum	5 % Gummi Arabicum	10 mg/kg KG als Mikrosuspension in 5% Gummi Arabicum	1 mg/kg KG	10 mg/kg KG + 1 mg/kg KG

Tabelle 2.1: Gruppenübersicht und Therapieplan.

2.2 Hämodynamische Messungen

Die hämodynamischen Messungen wurden zehn Wochen nach experimentellem Myokardinfarkt durchgeführt. Dazu wurden die Tiere während der vorbereitenden Maßnahmen zunächst mit Isofluran narkotisiert und anschließend intubiert und beatmet. Nach Aufsuchen der rechten A. carotis wurde diese punktiert und ein Kochsalz-gefüllter Katheter (*PE 50; Portex, Kent, England*) über das Gefäß in den linken Ventrikel vorgeschoben. Dieser war über einen Dreiwege-Hahn mit einem Millar Mikromanometer (*Millar Instruments, USA*) und einem Druckwandler (*Modell P-50; Statham, Gould, USA*) verbunden. Die Messungen des systolischen Drucks im linken Ventrikel (LVSP), des linksventrikulären enddiastolischen Druckes (LVEDP) und der Druckänderung in Abhängigkeit von der Zeit (dp/dt), die ein Maß für die Kontraktilität des kardialen Muskelgewebes darstellt, erfolgten unter leichter Anästhesie und Spontanatmung der Ratte mit oben beschriebenen Messaufbau.

Um die linksventrikulären Druck-Volumen-Beziehungen in vivo zu messen, wurde ein Conductance-Katheter (*SPR-774; Millar Instruments, USA*) verwendet, der ebenfalls über die PE-50-Schleuse in den linken Ventrikel eingebracht wurde, nachdem die hämodynamischen Messungen abgeschlossen waren. Somit konnten das linksventrikuläre endsystolische (LVESV) und enddiastolische Volumen (LVEDV) bestimmt werden. Die über den Conductance-Katheter gemessenen Volumina mussten durch Abzug des sogenannten Parallel-Volumens V_p korrigiert werden, da Ströme, die durch den umgebenden Herzmuskel fließen, falsch hohe Werte für das

intraventrikuläre Blutvolumen entstehen lassen. Zur Ermittlung von V_p wurden 15 bis 20 μl hypertone Kochsalzlösung in die V. jugularis injiziert. Ohne dabei signifikante Druck- oder Volumenveränderungen herbeizuführen, veränderte sich dadurch die Leitfähigkeit des Blutes im linken Ventrikel. Mit Hilfe der PVAN 2.8 Software (*Millar Instruments, USA*) konnten der Wert für V_p bestimmt und die übrigen hämodynamischen Daten berechnet werden. Die Darstellung der Druck- und Druck-Volumen-Kurven erfolgte mittels BioBench Software (*National Instruments, Austin, Texas*).

2.3 Probenentnahme und Infarktgrößenbestimmung

Nach Durchführung der hämodynamischen Messungen wurde das Herz des Versuchstiers durch intravenöse KCl-Injektion zum diastolischen Herzstillstand gebracht. In eiskalter isotoner Kochsalzlösung wurden anschließend die Vorhöfe entfernt und der rechte vom linken Ventrikel getrennt. Das Septum verblieb am LV. Danach wurde der LV transversal in drei Teile geteilt: Apex, mittlerer Ring und Herzbasis ($\approx 3\text{mm}$). Vom mittleren Ring wurden Gefrierschnitte zur weiteren Untersuchung angefertigt.

Die Bestimmung der Infarktgröße erfolgte mittels Planimetrie. Hierzu wurden die Gefrierschnitte des mittleren Ringes in 100 μm großen Intervallen in 5-7 μm dicke Scheiben geschnitten und diese auf einen Objektträger gebracht. Die Färbung erfolgte mit Picrius-Red, das zu einer dunkelroten Färbung des nekrotischen und zu einer ockergelben Färbung des vitalen Myokards führt. Die Picrius-Red-Färbung setzte sich aus 1 g Direct Red 80 in 1 l gesättigter Picrinsäure-Lösung (*Fluka; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland*) zusammen. Die Schnitte wurden mit Eukitt® (*Fluka; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland*) eingedeckt. Zur Digitalisierung wurden die fertigen Objekte mit einem Mikroskop (*Axioskop2; Zeiss, Deutschland*) 25-fach vergrößert und mit einer Videokamera mit Videoschnittstelle (*DLX-930 P; Sony, Japan*) auf einen Rechner übertragen. Hier erfolgten die planimetrischen Messungen mittels der

SigmaScan Pro 5.0 Software (Jandel Scientific, USA). Zum einen wurden die Absolutwerte für die epi- und endokardiale Infarkt Narbenlänge bestimmt, zum anderen der linksventrikuläre Gesamtumfang epi- und endokardial.

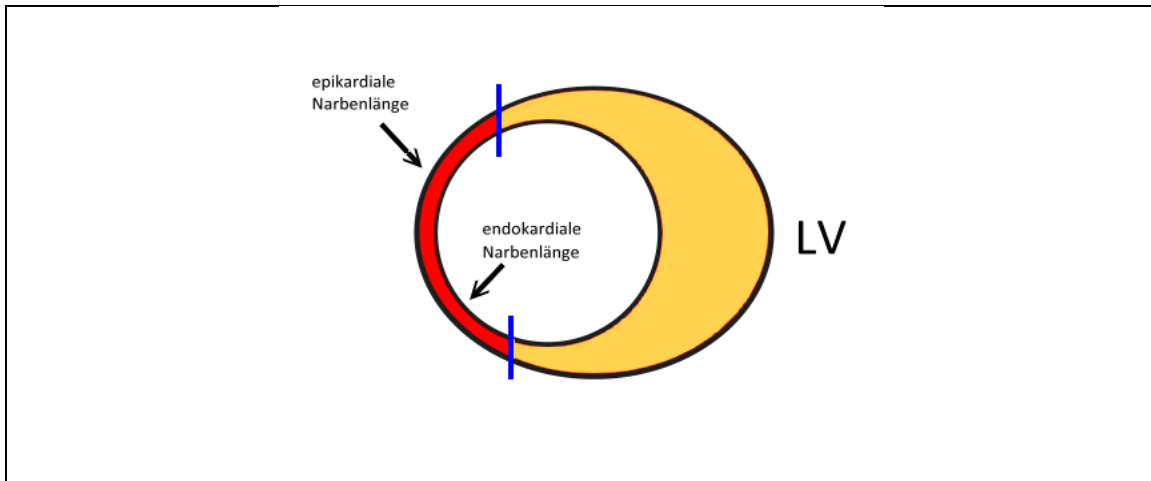


Abbildung 2.1: Schematische Skizze eines gefärbten Schnittes. Dunkel gefärbt ist der Narbenbereich, hell gefärbt das vitale Myokard

Hieraus errechnete sich die relative Größe der Infarkt Narbe als prozentualer Anteil des Gesamtumfangs. Bei jedem Versuchstier ergab sich der endgültige Wert für die relative Infarktgröße aus dem Mittelwert aller Schnitte:

$$\text{rel. Infarktgröße} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left[\left(\frac{\text{epikardiale Narbenlänge}}{\text{epikardialer Umfang}_{LV}} + \frac{\text{endokardiale Narbenlänge}}{\text{endokardialer Umfang}_{LV}} \right) / 2 \right]_i$$

Formel 2.1: Berechnung der relative Infarktgröße. Dabei ist n die Anzahl der vorhandenen Schnitte pro Versuchstier. LV bedeutet „linker Ventrikel“.

Es wurden nur Tiere mit Infarktgrößen > 40% und < 60% eingeschlossen.

2.4 Probenaufbereitung

Da die Auswirkungen des Remodelings auf das überlebende Myokard des linken Ventrikels untersucht werden sollten, wurde das Narbengewebe vom überlebenden

Myokard der linken Kammer abgetrennt und nur letzteres für die weiteren Versuche verwendet.

2.5 Myozytengrößenbestimmung

Zur Vermessung der durchschnittlichen Myozytengröße einer Probe von überlebendem Myokard des linken Ventrikels verwendeten wir die Epifluoreszenzmikroskopie. Dabei war wichtig, dass die Plasmamembranen der einzelnen Zellen als Begrenzung der zu messenden Fläche und der Kern der Zelle zur sicheren Unterscheidung zwischen Zelle und Blutgefäß oder Artefakt gut sichtbar waren. Es wurden nur Kardiomyozyten ausgewertet, die diese Voraussetzung erfüllten.

Die vom linken Ventrikel angefertigten Gefrierschnitte (5 μm) wurden langsam im Wärmeschrank bei 37 °C auf Raumtemperatur erwärmt und für drei Minuten in reinem Aceton (*Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland*) fixiert mit anschließender Lufttrocknung für fünf Minuten. Vor dem Färben wurden die Proben noch dreimal in 0,01 M PBS-Puffer (*P3813 PBS Puder, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland*) gewaschen. Zur Membrandarstellung verwendeten wir Alexa Fluor® 594 wheat germ agglutinin (*Alexa Fluor® 594 WGA, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland*) mit einem Anregungs-/Emissionsmaximum bei einer Wellenlänge von etwa 591/618 nm. Dieses liegt in gefriergetrockneter Form vor und wird mit PBS-Puffer zu einer 1 mg/ml konzentrierten Grundlösung angesetzt und anschließend bei -20 °C gekühlt aufbewahrt. Zur Darstellung des Kerns wurde der DNA-spezifische Farbstoff Hoechst 33342 (*Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland*) mit einem Anregungs-/Emissionsmaximum bei 350/461 nm verwendet. Beide Farbstoffe wurden in einem Färbevorgang angewendet. Dazu bereiteten wir eine 4 μM Lösung aus Hoechst 33342 in PBS, die ebenfalls Alexa Fluor® 594 in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ enthielt. Die Proben wurden für 15 Minuten mit dieser Lösung überschichtet und anschließend viermal in PBS gewaschen. Als Eindeckmittel wurde Vectashield® Mounting Medium (*Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA*) verwendet.

Die Objekte wurden mithilfe eines Fluoreszenzmikroskopes bei 200-facher Vergrößerung betrachtet. Um einen repräsentativen Mittelwert für die Myozytengröße einer Probe zu erhalten, wurden von jedem Schnitt Videoaufnahmen in sechs bis acht unterschiedlichen Gesichtsfeldern gemacht, nämlich jeweils drei bis vier Aufnahmen von im epikardialen sowie endokardialen Bereich gelegenen Myokard. Über eine Videoschnittstelle wurden die Aufnahmen an einen Rechner übertragen und dort mit SigmaScan Pro 5.0 verarbeitet.

Mit Hilfe des kumulativen magnetischen Lasso-Tools der Bildbearbeitungssoftware Adobe Photoshop 6.0 (*Adobe Systems Inc., California, USA*) wurden die membrandarstellenden Linien von mindestens 20 Zellen pro Aufnahme, bei denen sowohl Membran als auch Kern deutlich sichtbar waren, aufgesucht und markiert. Mithilfe der Software wurde die vom Lasso eingefangene Fläche in Pixel ermittelt.

Die durchschnittliche Myozytengröße (in Pixeln) im linken Ventrikel eines Versuchstiers errechnete sich dann über folgende Formel, dabei ist n die Anzahl der Aufnahmen pro Präparat:

$$\bar{A}_{\text{Myozyt}} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left(\frac{\text{Eingefangene Fläche im Bild [Pixel]}}{\text{Zahl der umrandeten Zellen}} \right)_i$$

Formel 2.2: Berechnung des Mittelwerts der relativen Myozytengröße pro Versuchstier (\bar{A}_{Myozyt}). Dabei ist n die Zahl der Aufnahmen pro Präparat.

2.6 Bestimmung des Kollagengehalts im überlebenden Myokard

Der quantitative Kollagengehalt in Prozent im überlebenden Myokard wurde mittels Hellfeldmikroskopie wie vorbeschrieben [22, 36] mit geringen Modifikationen bestimmt. Dazu wurden Formalin-fixierte, mit Picosirus-Rot gefärbte und in Paraffin eingebettete 7 μm dicke Schnitte aus dem interventrikulären Septum unter einem

Video Analyse System bestehend aus einem Mikroskop mit 10x Objektiv (*Axioskop2; Zeiss, Deutschland*), einer CCD Video Kamera (*DLX-930 P; Sony, Japan*), und verarbeitender Software (*Sigma Scan Pro 5.0, Jandel Scientific, USA*) zunächst durch einen rot absorbierenden Blaufilter (*Schott BG23 3.0, Itos*) aufgenommen. Die rote Farbe der gefärbten Kollagenfasern wird hierdurch gefiltert und die Fasern erscheinen dunkel im Vergleich zu den hellen Myozyten. Der identische Bildausschnitt wurde dann nochmals im polarisierten Licht eingelesen (hier stellen sich die Kollagenfasern hell und das restliche Gewebe dunkel dar) und die Helligkeitswerte der einzelnen Pixel digital subtrahiert. Alle Bildpunkte mit einem Graustufenwert größer 0 (entspricht dem Code für schwarz) oder gleich 1 (entspricht weiß) repräsentieren so Kollagen [36]. Nach einer Binärumwandlung (Alle Graustufenwerte größer 0 werden auf 1 gesetzt) erscheint das Bild schwarzweiß, wobei weiße Areale Kollagen darstellen. So konnte schließlich der Kollagengehalt mittels Scion Image for Windows Version Beta 4.0.2 (*Scion Cooperation, Maryland, USA*) quantifiziert werden, wobei Kollagen als der Anteil der weißen Pixel erfasst wurde. Der Kollagengehalt in Prozent wurde aus jeweils drei zufällig ausgewählten Bereichen des Septums berechnet und gemittelt.

2.7 Biochemische Messungen

2.7.1 Messung der myokardialen und mitochondrialen Superoxid-anionenproduktion

Zur Bestimmung und Quantifizierung der Superoxidanionenmenge in intaktem myokardialen Gewebe arbeiteten wir mit Hydroethidin (HE), welches mit $O_2^{\cdot -}$ zu einem spezifischen Produkt, nämlich 2-Hydroxyethidium ($2-OHE^+$) reagiert. Andere ROS (reactive oxygen species) wie z.B. OH^- , H_2O_2 und Peroxynitrit ($ONOO^-$) dagegen reagieren mit HE zu Ethidium (E^+). Dieses bildet sich auch bei der Reaktion von HE mit Licht z.B. während der Probenaufbereitung [37, 38]. Die folgende Grafik zeigt die Strukturformeln von HE, E^+ und $2-OHE^+$ (Abbildung 2.2).

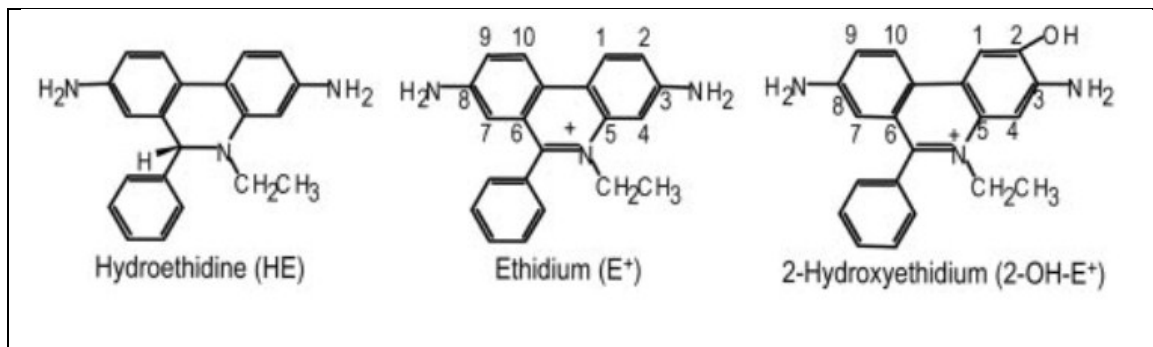


Abbildung 2.2: Strukturformeln von Hydroethidin, Ethidium und Hydroxyethidium. Nach Zhao et al. [39].

Zur Quantifizierung der Superoxidanionenmenge in isolierten Mitochondrien verwendeten wir anstatt Hydroethidin das Mitochondrien-selektive Mito-HE (*MitoSOX™ Red, M36008, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland*).

Um die Menge an gebildetem 2-OHE⁺ und E⁺ bzw. Mito-2-OHE⁺ und Mito-E⁺ zu quantifizieren, verwendeten wir die HPLC-EC-Methode (High Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection), die sich gegenüber der Bestimmung mittels Fluoreszenz durch hohe Sensitivität, gute Reproduzierbarkeit und schnelle Durchführbarkeit nicht nur unmittelbar nach Probenbereitung auszeichnet [39, 40].

2.7.1.1 Aufbereitung der Proben für die HPLC-EC aus intaktem Myokard

30 mg vom überlebenden Myokard des linken Ventrikels wurden in eiskaltem Krebs-HEPES Puffer (*Sigma Aldrich*) fein gemahlen und dann mit 10 μM Hydroethidin (*HE, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland*) in Krebs-HEPES Puffer für 20 min. bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde die Suspension sofort auf Eis gekühlt, um die weitere Reaktion zu unterbrechen, in Krebs-HEPES Puffer gewaschen, zentrifugiert und in 100 μl kaltes Methanol gegeben, in welchem zusätzlich 3,4-Dihydroxycinnaminsäure (*Sigma Aldrich*) in einer Konzentration von 5 nM als interner Standard gelöst war. Dieses Gemisch wurde homogenisiert und anschließend bei 10000g für 10 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, nochmals filtriert und mittels HPLC-EC gemessen.

2.7.1.2 Aufbereitung der Proben für die HPLC-EC aus isolierten Mitochondrien

Die Mitochondrien wurden zunächst aus dem Gewebe des linken Ventrikels isoliert mit Hilfe des Qproteome Mitochondria Isolation Kits (*QIAGEN, Hilden, Deutschland*). Anschließend wurden sie in Krebs-HEPES Puffer mit 10 μ M Mito-HE (*MitoSOX™ Red, M36008, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland*) für 20 min. bei 37 °C inkubiert und nachfolgend bei 6000g für 10 min. zentrifugiert. Nach dem Waschen mit Krebs-HEPES Puffer und erneutem Zentrifugieren bei gleichen Einstellungen für 10 min. erfolgte die Homogenisierung in 80 μ l kaltem Methanol mit 5 nM 3,4-Dihydroxycinnaminsäure. Durch Zentrifugieren für 10 min. bei 10000g gewann man schließlich den Überstand, der zur Analyse mittels HPLC-EC verwendet wurde.

2.7.1.3 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung des Proteingehalts aller so aufbereiteten Proben wurde das nach Zentrifugieren zurückbleibende Pellet mit 1 M NaOH über 48 Stunden verdaut und anschließend bei 14000 Umdrehungen für 4 min. zentrifugiert. Aus dem Überstand wurde dann die Proteinmenge mittels Bradford Protein Assay (*Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad*) bei 595 nm gegen einen Standard aus lyophilisiertem Rinder-IgG (*Protein Standard I, Bio-Rad*) photometrisch (*Ultrospec 3100 Pro, Amersham*) bestimmt.

2.7.1.4 Electrochemische High Performance Liquid Chromatography (HPLC-EC)

Die Chromatographie wurde mit einer Synergi 4 μ Polar-RP (Reverse Phase) 8A, 250x460 mm Säule (*00G-4336-E0, Phenomenex*) durchgeführt. Die Elution erfolgte isokratisch, also ohne Veränderung der mobilen Phase. Die Herstellung der mobilen Phase erfolgte aus Octansulfonsäure (100 μ M) und NaH₂PO₄ (50 mM), versetzt mit 35 % Acetonitril (v/v) zur Auftrennung von HE, 2-OHE⁺ und E⁺ bzw. 40% Acetonitril zur Trennung von Mito-HE, Mito-2-OHE⁺ und Mito-E⁺. Der pH-Wert der Lösung wurde mit Hilfe von 85 % Phosphorsäure (w/v) auf 2,7 eingestellt. Vor Nutzung wurde die mobile Phase filtriert (*0,45 μ m Filter, Millipore*) und vakuumentgast, um unruhige Basislinien und Druckschwankungen zu vermeiden. Die mobile Phase enthielt ein Ionenpaar-Reagenz, wodurch keine Gradientenseparation nötig ist, die Produkte sehr exakt aufgetrennt werden und der gesamte Trennungsvorgang nur 20 min. dauert.

Zur Separation war die Flussrate auf 0,9 ml/min eingestellt, die erste Elektrode der analytischen Zelle (*ESA Coulochem II Modell 5011*) wurde auf 0,00 V und die zweite auf +0,35 V gesetzt. Die 3,4-Dihydroxycinnaminsäure diente als innerer Standard zur quantitativen Analyse der Superoxidanionen-Produktion, in dem die Kurvenhöhen der Oxidationsprodukte und des inneren Standards miteinander in Relation gesetzt wurden. Dadurch ließen sich auch Fehler korrigieren, die alle Peaks der Elutionskurve in gleichem Maße betreffen würden, wie z.B. geringe Unterschiede in den Injektionsvolumina bei der Messung oder Verdünnungs-/Verdunstungsphänomene bei der Probenbereitung.

2.7.2 Western Blot

2.7.2.1 Gewinnung des Proteinlysats aus linksventrikulärem, überlebendem Myokard bzw. isolierten Mitochondrien

Zunächst wurde das Gewebe des linken Ventrikels bzw. die daraus isolierten Mitochondrien (wie in Kapitel 2.7.1.2 beschrieben) zusammen mit flüssigem Stickstoff in einem Mörser pulverisiert. Zu diesem Puder wurde dann eiskalter RIPA-Puffer (*150 mmol/l NaCl, 50 mmol/l Tris-Cl, 5 mmol/l EDTA, 1 %v/v Nonidet P-40, 0,5 %w/v Deoxycholat, 10 mmol/l NaF, 10 mmol/l Natriumpyrophosphat, 100 mmol/l Phenylmethyl-sulfonylfluorid, 2 µg/ml Aprotinin und 2 µg/ml Leupeptin*) hinzugefügt und diese Lösung auf Eis langsam aufgetaut. Der durch Zentrifugieren bei 4 °C und 8000g über 20 min. gewonnene Überstand wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C aufbewahrt.

2.7.2.2 Bestimmung des Proteingehalts

Der Proteingehalt aller so aufbereiteten Proben wurde mittels Bradford Protein Assay bei 595 nm gegen einen Standard aus lyophilisiertem Rinder-IgG (siehe oben) photometrisch bestimmt.

2.7.2.3 Western Blot Analyse

Nach Bestimmung des Proteingehalts wurden die LV-Extrakte (20-30 µg Protein pro Probe) bzw. die Proteinlysate aus isolierten Mitochondrien zunächst mit Loading-Buffer versetzt (*B7703, BioLabs, Frankfurt, Germany*), bei 95 °C für 5 min. denaturiert und unter reduzierenden Bedingungen auf 10-prozentigem SDS-Polyacrylamid-Gel getrennt. Danach erfolgte das Blotting auf eine PVDF-Membran (*Immun-Blot® 0,2 µm; Bio-Rad*) durch Elektrotransfer.

Die PVDF-Membran wurde für eine Stunde in Tris-gepuffertes Salz-Tween Lösung (TBS-T) zusammen mit 5-prozentigem Blocking-Reagenz (*Amersham, RPN2125V*) inkubiert, um alle unspezifischen Bindungsstellen für die primären Antikörper zu blockieren. Danach erfolgte die Inkubation über Nacht mit ebendiesen primären Antikörpern in TBS-T bei 4 °C.

Am Folgetag wurden die PVDF-Membranen zunächst mit TBS-T gewaschen und anschließend mit einem sekundären Antikörper (*Cell Signaling Technology, Anti-Mouse-IgG, #7076*), der mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war, in der Verdünnung 1:10000 für eine Stunde inkubiert. Auf den danach noch ein weiteres Mal gewaschenen Proben konnten die Proteinbanden schließlich durch Chemilumineszenz-Assay (*ECL & ECLplus, Amersham; Entwicklermaschine: Kodak IS 440 CF*) sichtbar gemacht werden. Alle Blots wurden auf Autoradiographiefilmen (*Hyperfilm™ECL, Amersham*) dokumentiert und densitometrisch ausgewertet (*Scion Image for Windows Version Beta 4.0.2, Scion Cooperation*).

Als primäre Antikörper wurden verwendet: gp91phox (*BD Biosciences Pharmingen, 611414*), UCP3 (*Acris Antibodies, SP5134P*), β-Actin (*Cell Signaling Technology, #4967*), COXIV (*Cell Signaling Technology, #4844*).

Als Referenz zur Bestimmung der Molekulargewichte wurden Prestained SDS-Page Standards (*SDS-PAGE Standard, Cell Signaling Technology*) sowie Precision Protein Standards (*Precision Protein Standards, Bio-Rad*) verwendet.

2.8 Microarray-Analyse

Zur Analyse wurde entweder überlebendes Myokard des linken Ventrikels verwendet oder das Ventrikelseptum von Sham-operierten Tieren. Dieses Material wurde zunächst zur Extraktion der RNA in einem Mörser mit flüssigem Stickstoff fein zerrieben. Anschließend wurden 50mg dieses Pulvers mit 1ml TRIzol-Reagenzlösung (*Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland*) versetzt. Die RNA wurde mit einem RNeasy Mini Kit (*QIAGEN, Hilden, Deutschland*) gereinigt und mittels UV-Spektrophotometrie quantifiziert. Die Beurteilung der Qualität erfolgte mit dem Bioanalyzer 2100 (*Agilent, Deutschland*). Gemäß den Herstellerangaben wurden die RNA-Proben in biotinylierte cRNA umgeschrieben und mit dem GeneChip® Rat Expression Array 230 2.0 (*Affimetrix*) hybridisiert. Diese Arrays mit der angelagerten cRNA wurden mit Streptavidin-Phykoerythrin-Konjugat gefärbt und vom GeneArray® Scanner (*Affimetrix*) gelesen. Dieser ermittelte die Menge des emittierten Lichts bei 570nm Wellenlänge. Die anschließende Datenanalyse wurde unter Verwendung von R-Packages vom Bioconductor Project durchgeführt.

2.9 Statistische Auswertung

Alle Ergebnisse sind als arithmetisches Mittel \pm Standardfehler (mean \pm SEM) angegeben. Die Prüfung der Nullhypothese H_0 : „Die Ergebnisse in den einzelnen Gruppen sind gleich“ auf Signifikanz erfolgte mittels One-Way-ANOVA. Anschließend multiple Vergleiche der einzelnen Werte wurden mittels Fisher's least significant difference test durchgeführt. Ein Wahrscheinlichkeitswert von $P < 0.05$ für H_0 wurde als statistisch signifikant, $P < 0.01$ für H_0 als hochsignifikant festgelegt. Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe von OriginPro 8.5 (*OriginLab Corp., Massachusetts, USA*) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Globalparameter der Versuchstiere

3.1.1 Körpergewicht, Infarktgröße und Ventrikelmorphologie

Das Körpergewicht der Tiere und die Infarktgrößen bei Tieren mit Myokardinfarkt (MI) waren in allen Gruppen vergleichbar (Tabelle 3.1).

	Sham	Placebo (MI)	HMR (MI)	R (MI)	HMR+R (MI)
n	13	17	15	18	19
MI-Size (%)	-	49±1	48±1	48±1	49±1
KG (g)	463±13	452±11	458±9	455±10	436±10

Tabelle 3.1: Globale Parameter der scheinoperierten Tiere (Sham) und der Tiere mit Myokardinfarkt (MI). Körpergewicht (KG) in Gramm, Infarktgröße (MI-Size) in Prozent, n = Zahl der Versuchstiere. HMR = Ataciguat (HMR1766), R = Ramipril, HMR + R = Kombination aus Ataciguat und Ramipril. MI = Myokardinfarkt. Mittelwerte ± SEM.

Abbildung 3.1 zeigt histologische Querschnitte durch den mittleren Teil des linken Ventrikels von scheinoperierten Tieren (Sham) und Tieren mit Myokardinfarkt.



Abbildung 3.1: Transversalschnitte vom mittleren Ring des linken Ventrikels (Picrosirius-Rot-Färbung). Der rot gefärbte Bereich stellt das Narbenareal dar, der gelbe Bereich das überlebende Myokard. Die Bilder repräsentieren Beispiele für die Infarktausdehnung in den einzelnen Versuchsgruppen. HMR = Ataciguat (HMR1766), R = Ramipril, HMR + R = Kombination aus Ataciguat und Ramipril. MI = Myokardinfarkt, Sham = scheinoperierte Tiere.

Man sieht anteriore Myokardinfarkte, die sich bis in die anterolaterale Wand ausdehnen. Folge ist eine Vergrößerung des linksventrikulären Ventrikel-Durchmessers

und der linksventrikulären Ventrikel-Querschnittsfläche. Diese Veränderungen wurden am effektivsten durch eine Kombination aus Ataciguat und Ramipril normalisiert.

Die Masse des linken Ventrikels im Verhältnis zum Körpergewicht (LV/KG, siehe Abbildung 3.2a) war bei Tieren mit Myokardinfarkt und Placebo-Therapie signifikant höher als bei scheinoperierten Tieren und konnte nur durch die Kombinationstherapie hochsignifikant gesenkt werden gegenüber Placebo. Die Kombination erreichte zudem hochsignifikant bessere Ergebnisse als jede Form der Monotherapie.

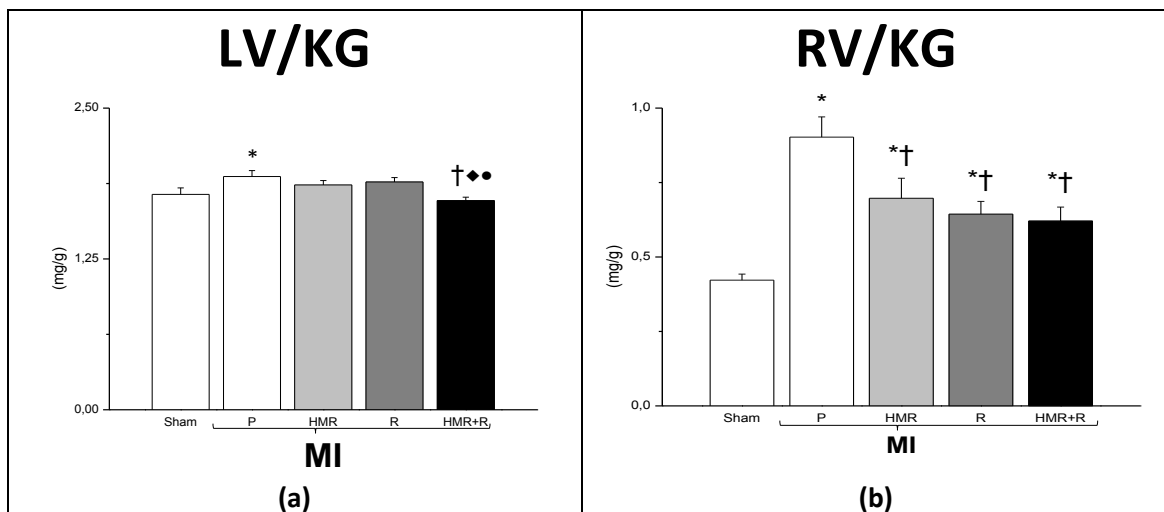


Abbildung 3.2: Verhältnis des Gewichts des (a) linken Ventrikels (LV) bzw. (b) rechten Ventrikels (RV) zum Gesamtkörpergewicht (KG) in mg/g. Sham = scheinoperierte Tiere, MI = Tiere mit Myokardinfarkt, HMR = Ataciguat (HMR1766), R = Ramipril, HMR + R = Kombination aus Ataciguat und Ramipril. MI = Myokardinfarkt. Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$ gegenüber Sham; † $p < 0,01$ gegenüber Placebo (MI), ◆ $p < 0,01$ gegenüber R (MI), ● $p < 0,01$ gegenüber HMR (MI).

Die Masse des rechten Ventrikels (RV) im Verhältnis zum Körpergewicht (RV/KG, siehe Abbildung 3.2b) war bei Tieren mit Myokardinfarkt signifikant höher als bei scheinoperierten Tieren und konnte sowohl durch Einzeltherapien als auch durch die Kombinationstherapie signifikant gesenkt werden gegenüber Placebo.

3.1.2 Lungenflüssigkeit

Durch ventrikuläre Dysfunktion bzw. Herzinsuffizienz kann es zur vermehrten Ansammlung von Flüssigkeit in der Lunge kommen (Abbildung 3.3).

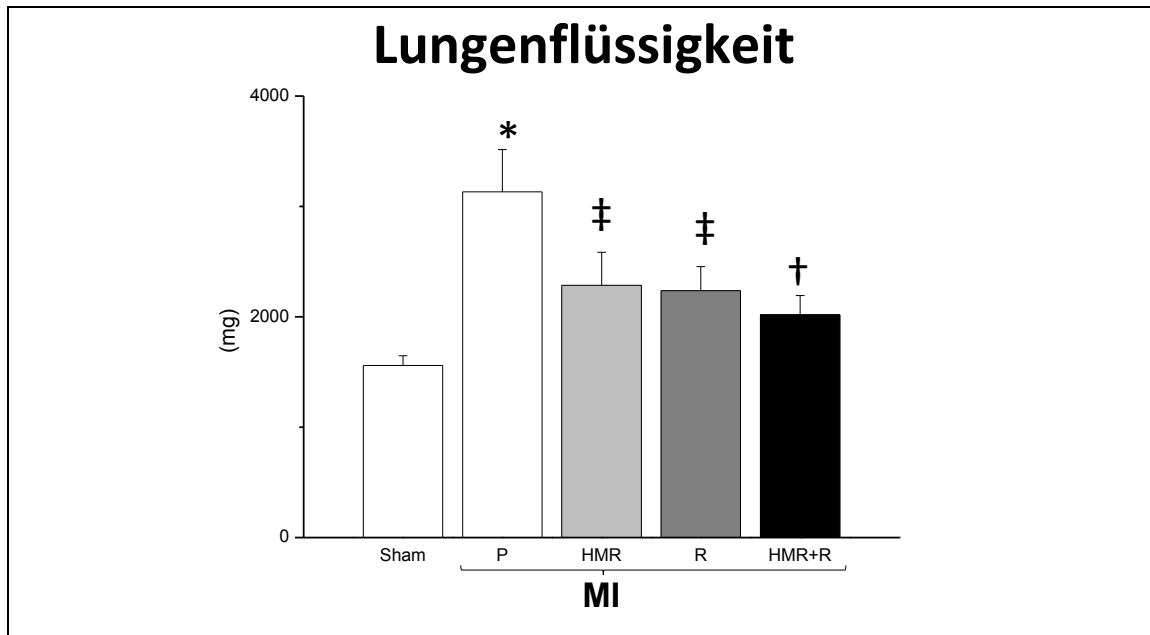


Abbildung 3.3: Flüssigkeitsmenge in der Lunge in Milligramm bei scheinoperierten Tieren (Sham) und Tieren nach Myokardinfarkt (MI). HMR = Ataciguat (HMR1766), R = Ramipril, HMR + R = Kombination aus Ataciguat und Ramipril. Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$ gegenüber Sham; ‡ $p < 0,05$, † $p < 0,01$ gegenüber Placebo (MI).

Die Placebogruppe zeigt signifikant erhöhte Mengen an Flüssigkeit in der Lunge gegenüber Sham. Bei den Tieren mit Myokardinfarkt, die eine Therapie erhielten, konnte die Lungenflüssigkeit gegenüber untherapierten Tieren (Placebo) signifikant gesenkt werden und durch Kombination aus Ataciguat und Ramipril sogar hochsignifikant.

3.2 Ergebnisse der hämodynamischen Messungen

3.2.1 Druckverhältnisse im linken Ventrikel

3.2.1.1 Linksventrikulärer systolischer Druck (LVSP)

Die Druckwerte des linken Ventrikels während der Systole (LVSP, in mmHg) sind in Abbildung 3.4 dargestellt. Der systolische Druck im linken Ventrikel war bei den Tieren mit Myokardinfarkt in allen Gruppen signifikant geringer als bei den scheinoperierten Tieren. Die Therapie mit HMR1766 war der Therapie mit Ramipril signifikant überlegen und zeigte tendenzielle Verbesserungen des linksventrikulären systolischen Drucks.

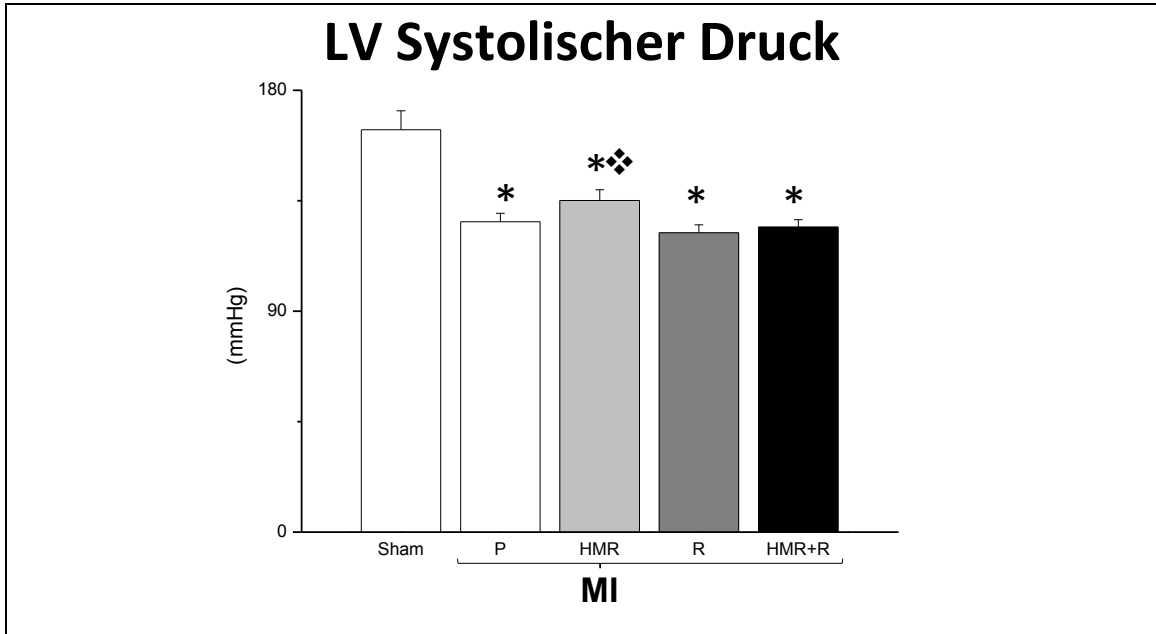


Abbildung 3.4: Linksventrikulärer systolischer Druck in mmHg bei scheinoperierten Tieren (Sham) und Tieren nach Myokardinfarkt (MI). HMR = Ataciguat (HMR1766), R = Ramipril, HMR + R = Kombination aus Ataciguat und Ramipril. Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$ gegenüber Sham; ♦ $p < 0,05$ gegenüber Ramipril (MI).

3.2.1.2 Linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP)

Abbildung 3.5 zeigt die Druckwerte im linken Ventrikel am Ende der Diastole (LVEDP) bei scheinoperierten Tieren und Tieren mit Myokardinfarkt.

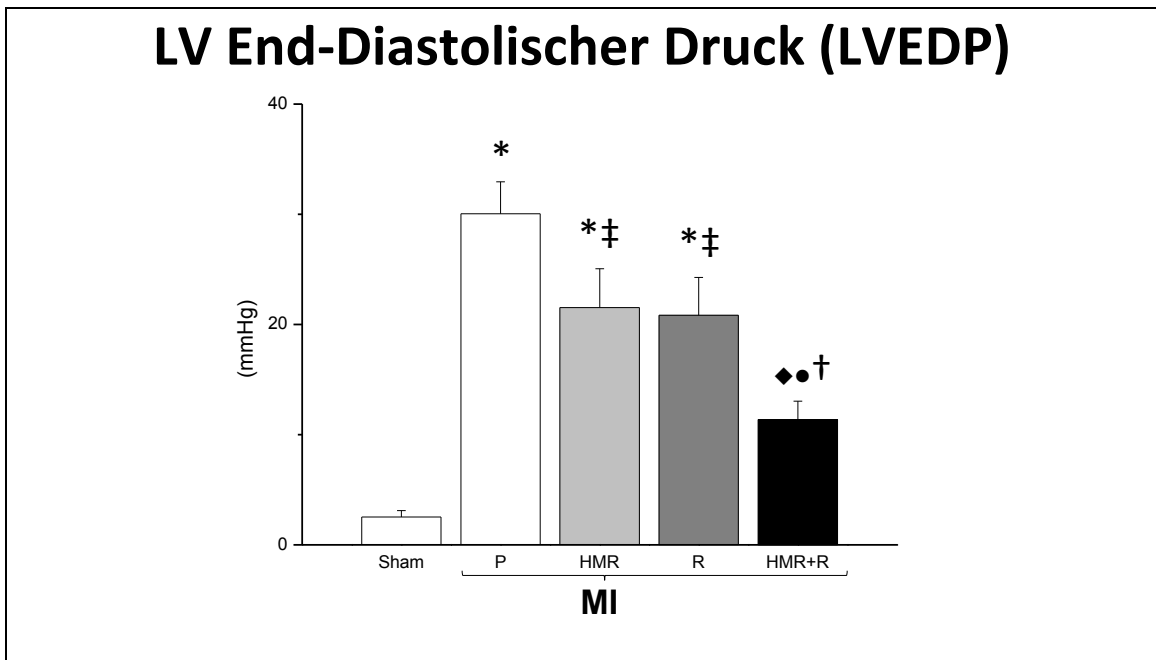


Abbildung 3.5: Linksventrikulärer enddiastolischer Druck in mmHg (Left Ventricular End-Diastolic Pressure, LVEDP). HMR = Ataciguat (HMR1766), R = Ramipril, HMR + R = Kombination aus Ataciguat und Ramipril. MI = Myokardinfarkt. Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$ gegenüber Sham; ‡ $p < 0,05$, † $p < 0,01$ gegenüber Placebo (MI), ♦ $p < 0,01$ gegenüber R (MI), ● $p < 0,01$ gegenüber HMR (MI).

Ratten, die nach Herzinfarkt nur Placebo erhielten, ebenso wie die Tiere, die eine Einfachtherapie mit Ataciguat oder Ramipril bekamen, zeigten signifikant höhere Drücke als scheinoperierte Tiere, wobei die Einfachtherapien eine signifikante Drucksenkung gegenüber Placebo erreichen konnten. Eine Kombinationstherapie (Gruppe HMR+R) senkte den LVEDP so weit, dass sich die Werte aus dieser Gruppe nicht mehr signifikant von Sham unterschieden und war damit signifikant effektiver als die Monotherapien mit Ataciguat bzw. Ramipril.

3.2.2 Auswurfleistung des linken Ventrikels

3.2.2.1 Volumenverhältnisse im linken Ventrikel

Abbildung 3.6 zeigt die grafische Darstellung des Volumens im linken Ventrikel am Ende der Diastole (LVEDV, a) und am Ende der Systole (LVESV, b).

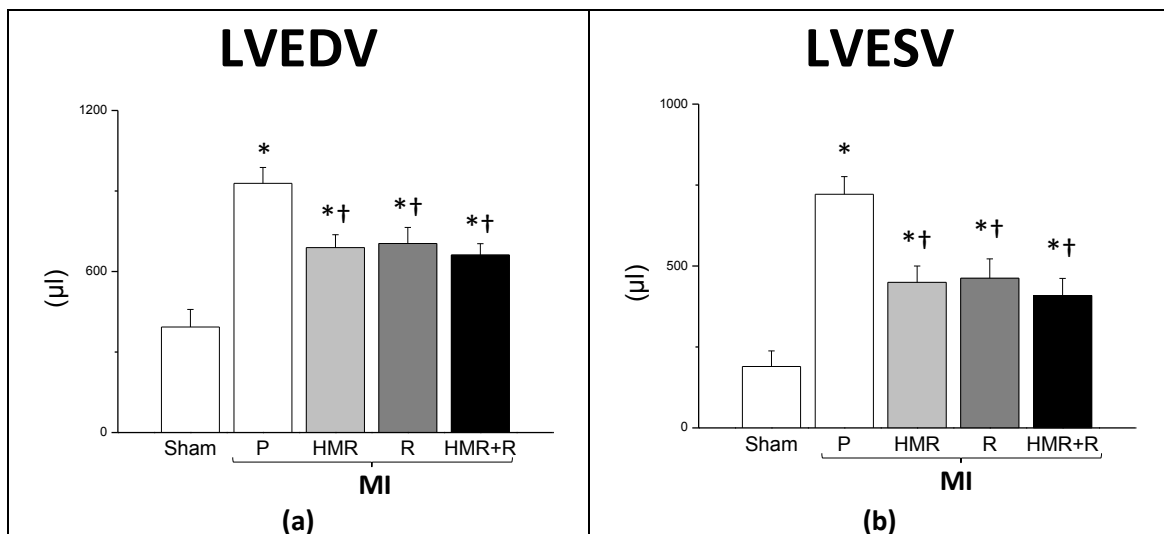


Abbildung 3.6: (a) Linksventrikuläres enddiastolisches Volumen (LVEDV) und (b) Linksventrikuläres endsystolisches Volumen (LVESV) in µl bei scheinoperierten Tieren (Sham) und Tieren nach Myokardinfarkt (MI). HMR = Ataciguat (HMR1766), R = Ramipril, HMR + R = Kombination aus Ataciguat und Ramipril. Mittelwerte ± SEM. * $p < 0,05$ gegenüber Sham; † $p < 0,01$ gegenüber Placebo (MI).

In der Diastole zeigten sich bei allen Tieren mit Myokardinfarkt gegenüber Sham signifikant erhöhte Volumina, jedoch hatten alle Tiere, die eine Therapie erhielten, ein hochsignifikant geringeres LVEDV im Vergleich zu Placebo. Auch am Ende der Systole zeigen sich bei Tieren mit Myokardinfarkt in allen Gruppen signifikant größere Volumina in der linken Kammer als bei scheinoperierten Tieren. Allerdings konnte auch

hier das LVESV in allen Gruppen, die eine Therapie erhielten, hochsignifikant gesenkt werden. Sowohl für LVEDV als auch für LVESV erreichte man mit der Kombinationstherapie die niedrigsten Werte im Vergleich mit Placebo.

3.2.2.2 Linksventrikuläre Ejektionsfraktion

Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (EF, Abbildung 3.7) gibt Auskunft über die Förderleistung des Herzens. Diese war in allen Gruppen der Tiere nach Herzinfarkt signifikant erniedrigt, bei Tieren aus der Placebogruppe sogar unter 40%. Die effektivste Steigerung der EF konnte mit der Kombinationstherapie aus Ataciguat und Ramipril erreicht werden, jedoch wurden auch in den Gruppen mit Einfachtherapie signifikante Steigerungen gegenüber Placebo erzielt.

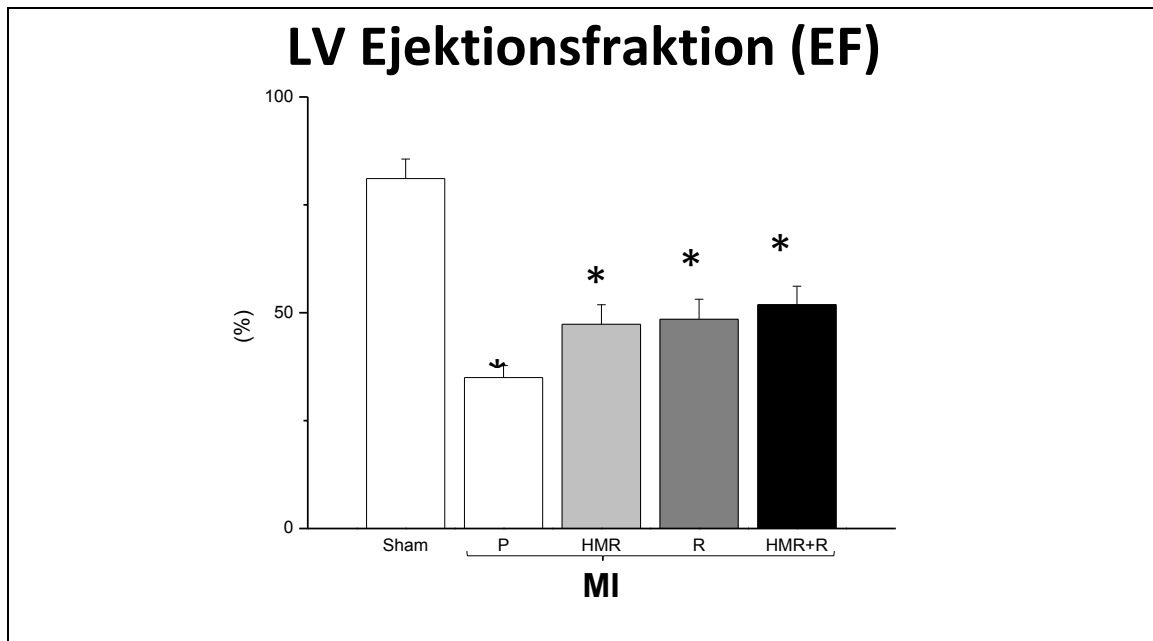


Abbildung 3.7: Linksventrikuläre Ejektionsfraktion in % (EF) bei scheinoperierten Tieren (Sham) und Tieren nach Myokardinfarkt (MI). HMR = Ataciguat (HMR1766), R = Ramipril, HMR + R = Kombination aus Ataciguat und Ramipril. Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$ gegenüber Sham; ‡ $p < 0,05$, † $p < 0,01$ gegenüber Placebo (MI).

3.2.3 Kontraktilitätsindizes

3.2.3.1 Maximale linksventrikuläre Druckerhöhungsgeschwindigkeit (LV dP/dt_{max}) und Druckabfallsgeschwindigkeit (LV dP/dt_{min})

Die maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit in der linken Herzkammer (LV dP/dt_{max} , Abbildung 3.8a) ist bei allen Gruppen nach MI signifikant geringer als bei den

scheinoperierten Tieren. Bei Therapie mit Ataciguat bzw. Ramipril zeigen sich signifikant höhere Werte als bei Placebo. Die Tiere mit Kombinationstherapie zeigen einen noch stärkeren Anstieg von dp/dt_{max} . Auch die maximale Druckabfallsgeschwindigkeit im linken Ventrikel (LV dp/dt_{min} , Abbildung 3.8b) ist nach Myokardinfarkt signifikant geringer als bei den scheinoperierten Tieren. Eine Therapie mit Ramipril brachte im Gegensatz zu den anderen Therapieoptionen keine signifikante Besserung gegenüber Placebo.

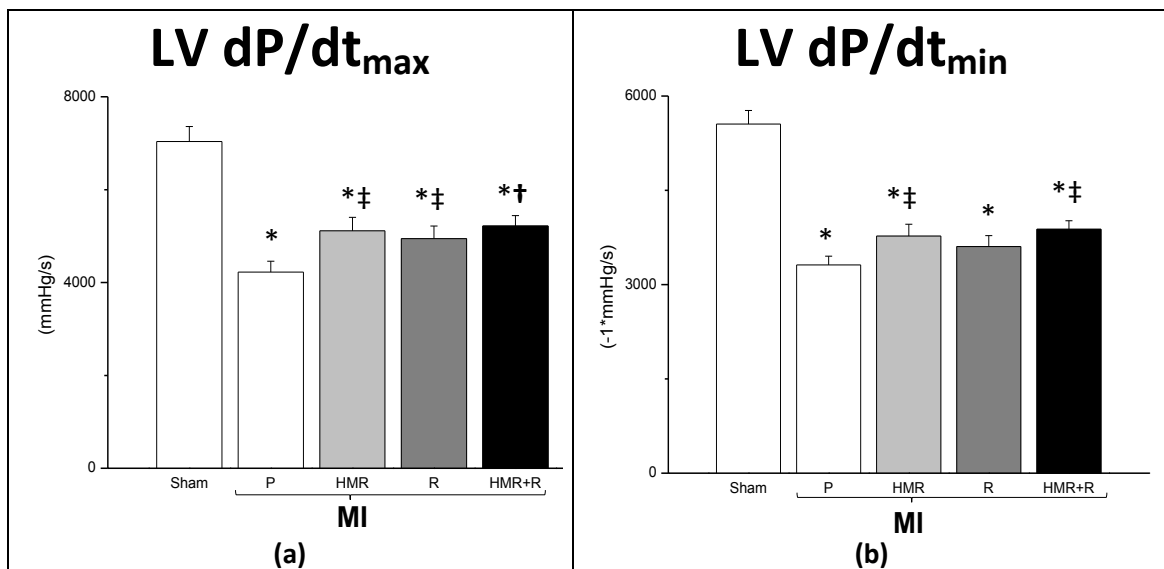


Abbildung 3.8: (a) Maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit in mmHg/s und (b) maximale linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit in $-1 \cdot mmHg/s$ bei scheinoperierten Tieren (Sham) und Tieren mit Myokardinfarkt (MI). HMR = Ataciguat (HMR1766), R = Ramipril, HMR + R = Kombination aus Ataciguat und Ramipril. Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$ gegenüber Sham; ‡ $p < 0,05$, † $p < 0,01$ gegenüber Placebo (MI).

3.2.3.2 Maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit bezogen auf den momentan entwickelten Ventrikeldruck ($dp/dt_{max}/IP$, IP= Instantaneous Pressure)

Um den Einfluss der Vorlast auszuschalten [41], wird die maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit auf den momentan entwickelten Ventrikeldruck bezogen (LV $dp/dt_{max}/IP$, IP = instantaneous pressure, Abbildung 3.9). Von den Monotherapien konnte Ramipril eine signifikante Besserung gegenüber Placebo ($p < 0,01$) erreichen. Die kombinierte Therapie mit Ataciguat und Ramipril konnte sogar erreichen, dass sich LV $dp/dt_{max}/IP$ auf mit Sham vergleichbare Werte normalisiert

($p < 0,0001$ gegenüber Placebo) und zeigte damit signifikant bessere Werte als beide Formen der Monotherapie.

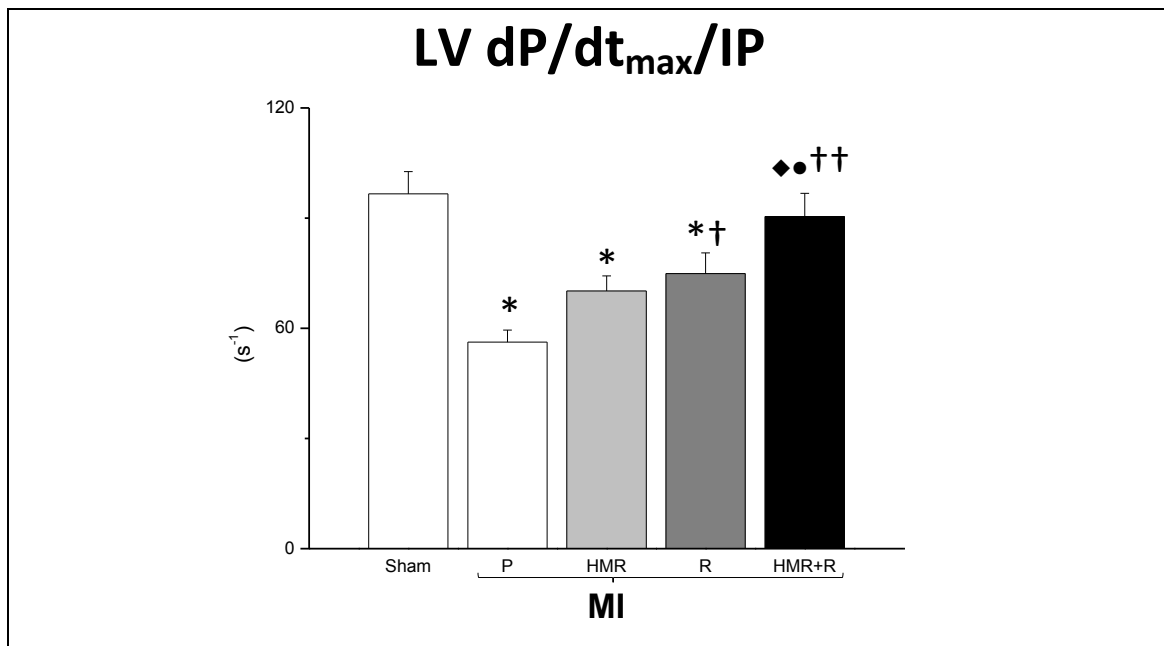
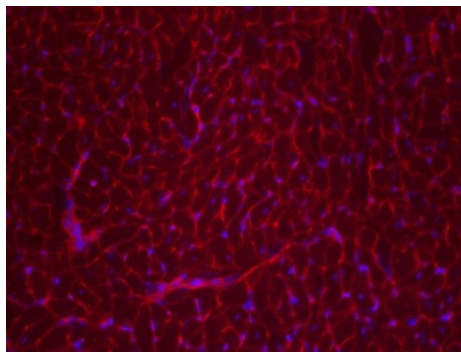


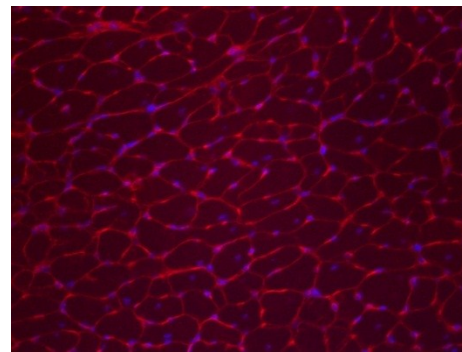
Abbildung 3.9: Maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit bezogen auf den momentan entwickelten Ventrikeldruck in 1/s. HMR = Ataciguat (HMR1766), R = Ramipril, HMR + R = Kombination aus Ataciguat und Ramipril. MI = Myokardinfarkt. Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$ gegenüber Sham; † $p < 0,01$ gegenüber Placebo (MI), †† $p < 0,0001$ gegenüber Placebo (MI), ♦ $p < 0,01$ gegenüber R (MI), ● $p < 0,01$ gegenüber HMR (MI).

3.3 Ergebnisse der Myozytengrößenbestimmung

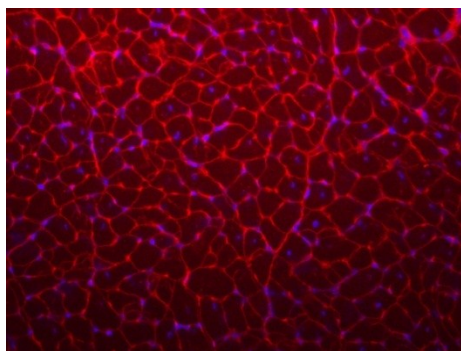
In Abbildung 3.10a-e sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von Myozyten aus dem linken Ventrikel im Querschnitt gezeigt. Die gemessenen Werte für die mittlere Fläche der querschnittenen Myozyten in den einzelnen Versuchsgruppen wird in Abbildung 3.10f grafisch dargestellt. Der Mittelwert für die Fläche der Myozyten bei scheinoperierten Tieren lag unter $350 \mu\text{m}^2$, bei allen anderen Versuchsgruppen signifikant darüber. Gegenüber Placebo konnte die Myozytengröße sowohl durch Ramipril als auch durch Ataciguat sichtbar gesenkt werden, mit einer Signifikanz von $p < 0,05$. Die Kombination aus Ramipril und HMR1766 konnte die hypertrophischen Veränderungen der Herzmuskelzellen sogar noch weiter beeinflussen mit einer Signifikanz von $p < 0,01$.



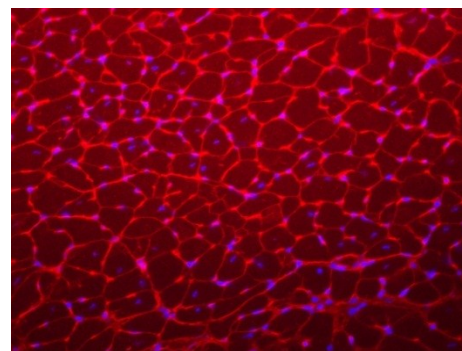
(a) Sham



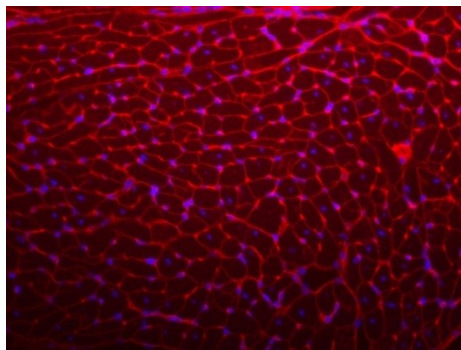
(b) Placebo



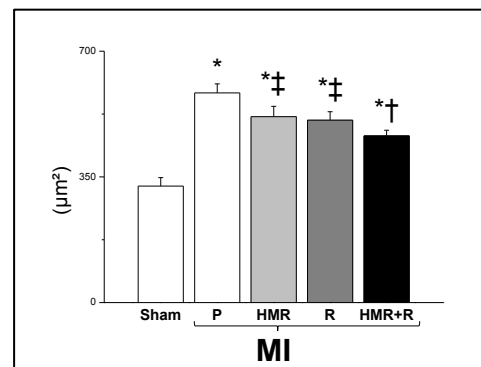
(c) HMR



(d) Ramipril



(e) HMR + Ramipril



(f) Mittelwerte ± SE aller Proben

Abbildung 3.10: Myozytengröße bei scheinoperierten Tieren (Sham) und Tieren mit Myokardinfarkt (MI). (a)-(e): Immunhistochemisch gefärbte Myozyten unter dem Fluoreszenzmikroskop. (f): Myozytengröße in μm^2 . HMR = Ataciguat (HMR1766), R = Ramipril, HMR + R = Kombination aus Ataciguat und Ramipril. Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$ gegenüber Sham; ‡ $p < 0,05$, † $p < 0,01$ gegenüber Placebo (MI).

3.4 Interstitielle Fibrose (Kollagenanteil im überlebenden Myokard des linken Ventrikels)

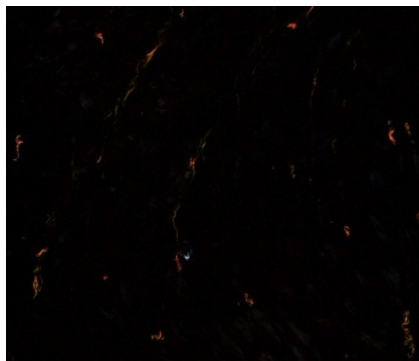
Abbildung 3.11a-e zeigt den Kollagengehalt im überlebenden Myokard des linken Ventrikels der Tiere aus den einzelnen Versuchsgruppen nach Färbung der histologischen Schnitte mit Picrosirius-Rot und Belichtung mit zirkulär polarisiertem Licht. Rot schimmernde Areale stellen dabei das Kollagen dar, welches im Vergleich zu scheinoperierten Tieren (Sham) am meisten bei der Placebogruppe und am wenigsten bei der HMR+R-Gruppe zu sehen ist. Das Diagramm in Abbildung 3.11f zeigt den durch Binärumwandlung der Bilder ermittelten tatsächlichen prozentualen Kollagenanteil im Gewebe. Nur die Tiere, die Placebo erhielten, zeigten einen signifikant erhöhten Kollagenanteil im Herzmuskelgewebe. Alle anderen Gruppen, egal ob Einfach- oder Kombinationstherapie, zeigten keine signifikanten Unterschiede im Kollagenanteil gegenüber Sham und signifikant geringere Werte gegenüber Placebo. Die besten Ergebnisse konnten mit der Kombination aus Ataciguat und Ramipril erzielt werden, diese Form der Therapie war den Einfachtherapien signifikant überlegen.



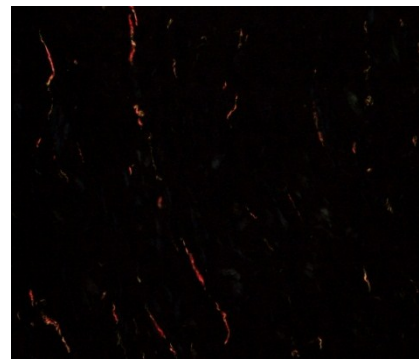
(a) Sham



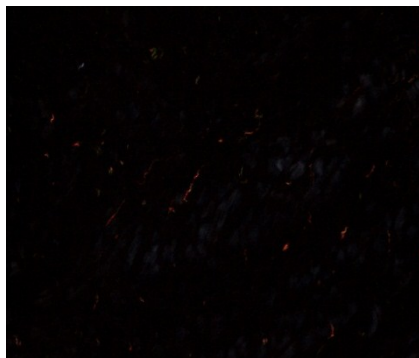
(b) Placebo



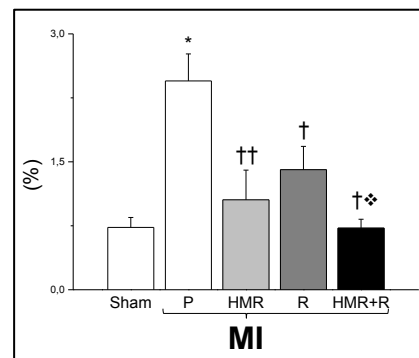
(c) HMR



(d) Ramipril



(e) HMR + Ramipril



(f) Mittelwerte \pm SE aller Proben

Abbildung 3.11: Kollagengehalt im linken Ventrikel bei scheinoperierten Tieren (Sham) und Tieren mit Myokardinfarkt (MI). (a)-(e): Dargestellt ist rötlich schimmerndes Kollagen nach Färbung histologischer Schnitte mit Picosirius-Rot und Belichtung mit zirkulär polarisiertem Licht. (f): Prozentualen Kollagenanteil im Gewebe. HMR = Ataciguat (HMR1766), R = Ramipril, HMR + R = Kombination aus Ataciguat und Ramipril. Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$ gegenüber Sham; † $p < 0,01$ gegenüber Placebo (MI), †† $p < 0,0001$ gegenüber Placebo (MI), ❖ $p < 0,05$ gegenüber R (MI).

3.5 Superoxidanionen-Produktion

Abbildung 3.12 vergleicht die linksventrikuläre Superoxidanionen-Produktion bei scheinoperierten Tieren und Tieren nach Myokardinfarkt im überlebenden Myokard des linken Ventrikels (a) und den daraus isolierten Mitochondrien (b).

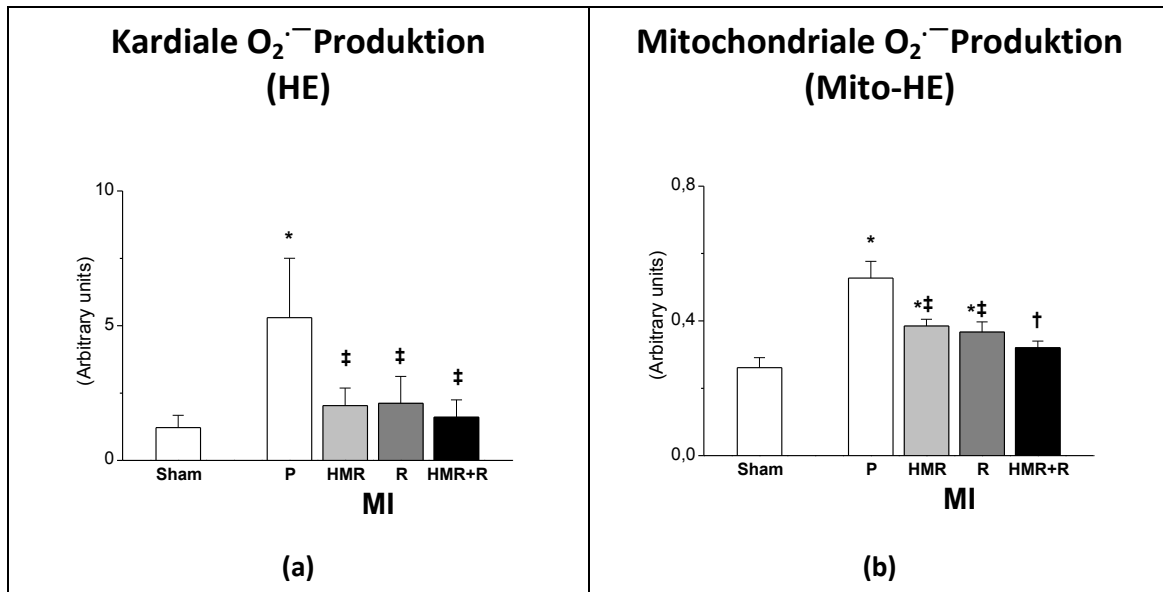


Abbildung 3.12: Vergleich der Sauerstoffradikalbildung im linken Ventrikel in willkürlichen Einheiten bei scheinoperierten Tieren (Sham) und Tieren mit Myokardinfarkt (MI). (a) Kardiale Superoxidanionen-Produktion und (b) mitochondriale Superoxidanionen-Produktion in den Kardiomyozyten. HE = Hydroethidium. HMR = Ataciguat (HMR1766), R = Ramipril, HMR + R = Kombination aus Ataciguat und Ramipril. Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$ gegenüber Sham; ‡ $p < 0,05$ gegenüber Placebo (MI).

3.5.1 Kardiale Superoxidanionen-Produktion

Im Vergleich mit scheinoperierten Tieren war bei Tieren mit Placebobehandlung die Menge an Superoxidanionen und damit der oxidative Stress im linksventrikulären überlebenden Myokard am größten ($p < 0,05$ gegenüber Sham). Bei allen Tieren, die eine medikamentöse Therapie erhielten, konnte der oxidative Stress gegenüber Placebo so weit gesenkt werden, dass auch keine signifikanten Unterschiede mehr gegenüber Sham bestanden. Tendenziell senkte dabei die Kombinationstherapie aus Ataciguat und Ramipril den oxidativen Stress am meisten.

3.5.2 Mitochondriale Superoxidanionen-Produktion

Die Gruppe von Tieren, die die Kombinationstherapie aus Ataciguat und Ramipril erhielt, zeigte vergleichbare $O_2^{\cdot-}$ -Werte zu denen von scheinoperierten Tieren, nachdem gegenüber Placebo die Superoxidanionenmenge signifikant mit $p < 0,01$ gesenkt werden konnte. Die Placebo-Gruppe hingegen wies deutlich erhöhte Werte gegenüber Sham auf ($p < 0,05$). Bei den Tieren, die Einzeltherapien erhielten, konnte die Sauerstoffradikalmenge zwar auch signifikant gesenkt werden ($p < 0,05$), trotzdem wiesen sie aber noch bedeutsam höhere Werte auf als die scheinoperierten Tiere.

3.6 Ergebnisse der Microarray-Analyse

Abbildung 3.13 zeigt die Auswertung der Microarray-Analyse im Venn-Diagramm bei den Tieren mit Myokardinfarkt.

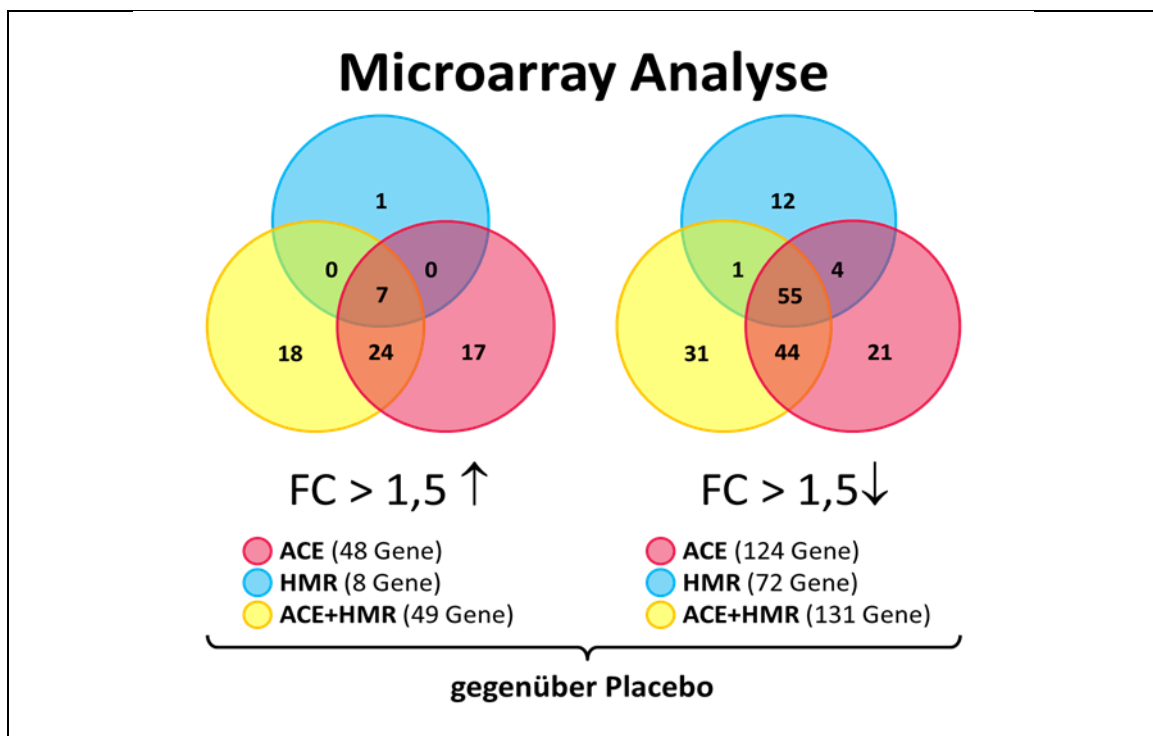


Abbildung 3.13: Venn-Diagramme zur Microarray Analyse bei Tieren mit Myokardinfarkt. Gezeigt sind die Hoch- bzw. Herunterregulation der Genexpression durch HMR, Ramipril oder die Kombination im Vergleich zu Ratten mit Placebomedikation. Mit fold-change (FC) wird das Verhältnis der Genexpression in Bezug zum Grundniveau bezeichnet. $p < 0,05$.

Auf der linken Seite sieht man die Anzahl der Gene, deren Expression gegenüber Placebo mindestens um den Faktor 1,5 erhöht war (fold change = FC > 1,5). Auf der rechten Seite sieht man die Anzahl der Gene, deren Expression gegenüber Placebo mindestens um den Faktor 1,5 erniedrigt war.

8 Gene wurden durch Ataciguat (HMR, blau) hochreguliert, 48 durch Ramipril (ACE, rot). Durch die Kombinationstherapie (ACE+HMR, gelb) wurden 49 Gene hochreguliert. 7 verschiedene Gene wurden bei allen drei Therapien hochreguliert. 72 Gene wurden in der HMR-Gruppe vermindert exprimiert, 124 in der Ramipril-Gruppe. Auch hier finden sich nur 4 Gene, die sowohl in der HMR- als auch in der Ramiprilgruppe herunterreguliert waren. 131 Gene fanden sich in der Gruppe mit der Kombinationstherapie herunterreguliert. 55 Gene wurden durch alle drei Therapien herunterreguliert. In beiden Fällen ist auffällig, dass die Zahl der Gene, die sowohl in der HMR- als auch in der Ramipril-Gruppe beeinflusst wurden, sehr gering ist. 4 Gene wurden in beiden Gruppen herunterreguliert, kein einziges wurde sowohl in der HMR- als auch in der Ramipril-Gruppe heraufreguliert.

Es zeigte sich eine signifikante Regulation der Genexpression von gp91phox und UCP3 durch die Kombination aus HMR und Ramipril.

3.7 UCP3- und gp91phox-Expression

Es wurde die Proteinexpression von gp91phox (NOX2) im überlebenden Myokard des linken Ventrikels und von UCP3 in isolierten Mitochondrien aus dem linken Ventrikel gemessen (Abbildung 3.14a-b). Die Expression von gp91phox war bei Tieren, die nur eine Placebothherapie erhielten, gegenüber scheinoperierten Tieren signifikant erhöht. In allen Gruppen, die entweder eine Therapie mit Ataciguat, Ramipril oder beidem bekamen, konnten diese Werte signifikant so weit gesenkt werden, dass sie mit denen der Sham-Tiere vergleichbar waren, wobei die Kombinationstherapie den Wert am weitesten senkte. Die Expression von UCP3 dagegen war bei Placebo deutlich gegenüber Sham reduziert. Eine signifikante Erhöhung gegenüber Placebo wurde mit

der Kombination aus HMR1766 und Ramipril erreicht, die Einfachtherapien brachten ebenfalls tendenzielle Verbesserungen, sodass in den Gruppen HMR, R und HMR+R die Werte mit denen der scheinoperierten Tiere vergleichbar waren.

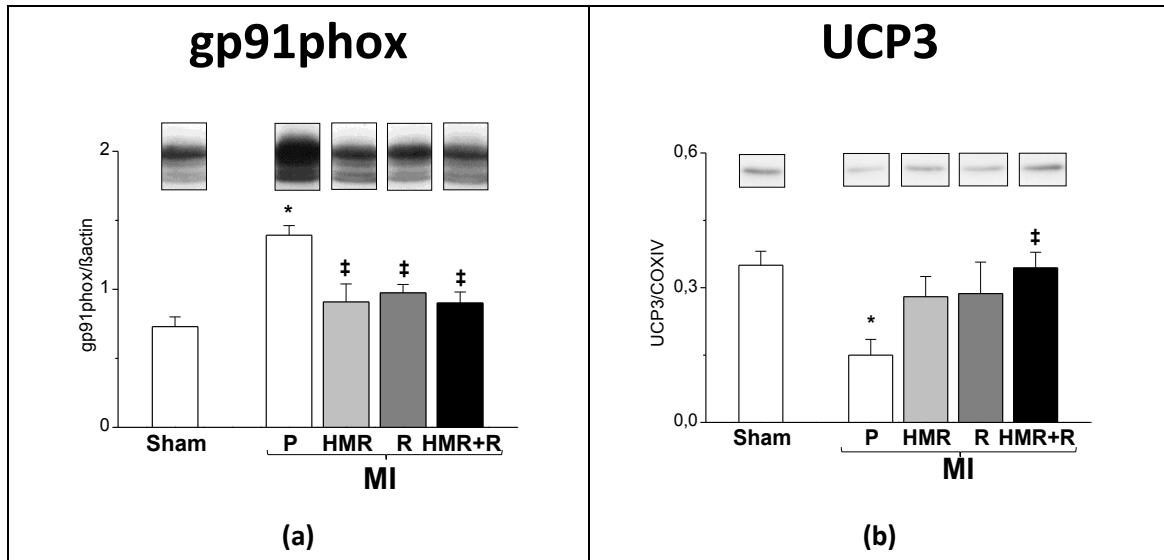


Abbildung 3.14: (a) Kardiale Proteinexpression von gp91phox sowie (b) mitochondriale Expression von UCP3 bei scheinoperierten Tieren (Sham) und Tieren mit Myokardinfarkt (MI). HMR = Ataciguat (HMR1766), R = Ramipril, HMR + R = Kombination aus Ataciguat und Ramipril. MI = Myokardinfarkt. Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$ gegenüber Sham; ‡ $p < 0,05$ gegenüber Placebo (MI).

4 Diskussion

Das kardiale Remodeling ist für die Entwicklung einer linksventrikulären Dysfunktion nach Myokardinfarkt von größter Bedeutung und wichtiges Ziel zahlreicher bestehender Postinfarkttherapien [42]. So sind bereits Behandlungen etabliert, die auf verschiedenen Ebenen eine Hemmung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems zur Folge haben [13, 43, 44]. Aufgrund der noch immer hohen Mortalität durch Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt sind jedoch weitere Entwicklungen in der Therapie erforderlich [4]. Seit einiger Zeit gewinnt der NO/sGC/cGMP-Signalweg im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen zunehmend an Bedeutung. NO vermittelt durch die sGC bzw. über cGMP positive Effekte auf die endotheliale Funktion und auf das kardiale Remodeling [3, 45, 46]. Bei Herzinsuffizienz ist dieser Signalweg aufgrund verminderter Bioverfügbarkeit von NO gestört [26]. Wie bereits beschrieben, kann Ataciguat die lösliche Guanylatzyklase NO-unabhängig aktivieren. Kürzlich wurden bereits positive Effekte auf die gestörte endotheliale Funktion bei Herzinsuffizienz durch Ataciguat nachgewiesen [35]. Diese Studie analysierte erstmals, ob eine Langzeittherapie mit Ataciguat das kardiale Remodeling bei Ratten nach Herzinfarkt beeinflussen kann und ob eine Kombinationstherapie aus Ataciguat und dem ACE-Hemmer Ramipril zusätzliche Effekte gegenüber einer Monotherapie bewirkt. Um die Phase der Heilung nach Myokardinfarkt innerhalb der ersten Tage unbeeinflusst zu lassen [9, 42], begannen wir mit der Therapie 10 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt durch Koronarligatur.

Die Tiere, die nur eine Placebothherapie erhielten, wiesen einen stark dilatierten und hypertrophierten Ventrikel auf mit deutlicher interstitieller Fibrose. Dementsprechend defizitär zeigte sich in den hämodynamischen Messungen die Leistungsfähigkeit des linken Ventrikels mit hohen Füllungsvolumina, geringer Auswurfleistung und mangelnder Kontraktilität. Ataciguat und Ramipril in Monotherapie verbesserten in vergleichbarem Umfang die Funktion und Leistung des linken Ventrikels sowie die

Myozytenhypertrophie und Fibrose im Rahmen des Remodelings. Zudem ergab sich eine deutliche Minderung der kardialen Superoxidanionen-Produktion in beiden Fällen, auch mitochondrial. Die kombinierte Gabe von Ataciguat und Ramipril brachte sogar einen weiteren, additiven Effekt auf die Verbesserung der Ventrikelfunktion, der Myozytenhypertrophie und Fibrose sowie der kardialen bzw. mitochondrialen Superoxidanionen-Produktion.

4.1 Effekte von Ataciguat und Ramipril auf Hämodynamik, Ventrikelmorphologie, Hypertrophie und Fibrose

Durch die Therapie mit Ataciguat verbesserte sich die Funktion des linken Ventrikels maßgeblich im Vergleich zu Placebo. Dadurch lassen sich auch die folglich geringere Hypertrophie des rechten Ventrikels und die mit Sham vergleichbaren Werte für die Lungenflüssigkeit erklären [47]. Die Werte waren dabei mit denen der Ramipril-Therapie vergleichbar. Die Kontraktions- und Relaxationsfähigkeit des Ventrikels erhöhte sich (Kontraktilitätsindizes $LV\ dp/dt_{max}/IP$ und $LV\ dp/dt_{min}$). Dies erklärt sich unter anderem durch die Ergebnisse zu Hypertrophie, Ventrikelgröße und interstitieller Fibrose, denn große Mengen an Kollagen im kardialen Gewebe erhöhen die Ventrikelsteifigkeit und hindern die Myozyten bei ihrer Relaxation [48]. Die Myozyten bei monotherapierten Tieren waren im Vergleich zu Placebo deutlich kleiner und es fand sich wesentlich weniger Kollagen im Gewebe, der Durchmesser des linken Ventrikels war geringer. Dementsprechend ließ sich der LVEDP als ein Maß des linksventrikulären Pumpversagens signifikant durch die Therapien senken, die in Systole und Diastole bewegten Blutvolumina waren geringer, die Ejektionsfraktion erhöht. Eine schlechte Auswurfleistung des linken Ventrikels führt zur RAAS-Aktivierung über die Niere, was durch die Bildung von Angiotensin II weiter das Remodeling vorantreiben würde, einmal durch direkte Modulation verschiedener Gene [14], aber auch durch Stimulation der NADPH-Oxidasen und konsekutiv vermehrte ROS-Produktion [49]. Ramipril durchbricht diesen circulus vitiosus, stoppt

dadurch erwiesenermaßen das kardiale Remodeling und verbessert dadurch auch die linksventrikuläre Funktion [6, 50]. Ataciguat vermindert ebenfalls Hypertrophie, Fibrose und den oxidativen Stress im Herzen und trägt damit gleichermaßen zur Verbesserung der Ventrikeldynamik bei, wie aus den Ergebnissen ersichtlich ist. Aber auch durch Beeinflussung des NO/sGC/cGMP-Signalweges erhöht sich die ventrikuläre Leistung. Eine kürzliche Studie zum Einfluss des PDE5-Hemmers Sildenafil auf die Ventrikelgeometrie und -funktion bei herzinsuffizienten Patienten zeigte, dass die Erhöhung von cGMP über PDE5-Hemmung die Ventrikelgeometrie und -funktion verbesserte [51]. NO vermittelt über die Guanylatzyklase vasodilatative, anti-apoptotische, anti-hypertrophische Effekte und verbessert die Kontraktilität der Kardiomyozyten [25, 26]. Durch Superoxidanionen oxidierte sGC interagiert nicht mehr mit NO, der Signalweg ist durchbrochen. HMR1766 dagegen aktiviert bevorzugt die oxidierte, Häm-defizitäre Form und erhöht seine Aktivität sogar zusätzlich in Anwesenheit von ROS [52], sodass die positiven Effekte von NO wieder über die Bildung von cGMP vermittelt werden können. Ataciguat beeinflusst damit indirekt die Menge an NO-sensitiver, reduzierter sGC über Minderung der oxidierenden Substanzen im Gewebe und direkt die Aktivität der oxidierten, NO-insensitiven Guanylatzyklase.

4.2 Additive Effekte der Kombinationstherapie

Ataciguat und Ramipril beeinflussen ganz verschiedene neurohumorale Systeme, die im Rahmen des kardialen Remodelings eine Rolle spielen. Durch sich überschneidende Punkte in beiden Systemen ergänzen sie sich hierbei, sodass sich bei der Kombinationstherapie mit beiden Substanzen durchgehend additive Effekte in den Ergebnissen zeigten. So konnte die Myozytengröße im linken Ventrikel nur durch die Kombinationstherapie noch weiter gesenkt werden. Der Kollagenanteil im Ventrikel wurde durch die Kombinationstherapie signifikant besser gesenkt als durch Ramipril alleine, so dass er mit den Werten der scheinoperierten Tiere vergleichbar war.

Dementsprechend konnte auch die Hämodynamik und der oxidative Stress im Ventrikel durch die Kombinationstherapie am besten beeinflusst werden.

Abbildung 4.1 zeigt schematisch den Zusammenhang zwischen Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, NO/sGC/cGMP-Signalweg und NO/Superoxidgleichgewicht sowie deren Auswirkungen auf die linksventrikuläre und endotheliale Funktion nach Myokardinfarkt. Die Aktivierung des RAAS nach Myokardinfarkt führt zur Bildung von Angiotensin II. Dieses bewirkt eine direkte Minderung der NO-Bioverfügbarkeit über Hemmung von Bradykinin [14], aber auch indirekt eine weitere Minderung über die Superoxidanionensynthese durch NADPH-Oxidasen [49]. Folge ist die Störung des NO/sGC/cGMP-Signalweges und die Oxidation der Guanylatzyklase, sodass positive Effekte durch NO nicht mehr vermittelt werden können [26]. Die Folge sind Erhöhung des peripheren Gefäßwiderstandes und endotheliale Dysfunktion bzw. Myozytenhypertrophie und kardiale Fibrose mit Verstärkung der linksventrikulären Dysfunktion. Ein circulus vitiosus stellt sich ein [53].

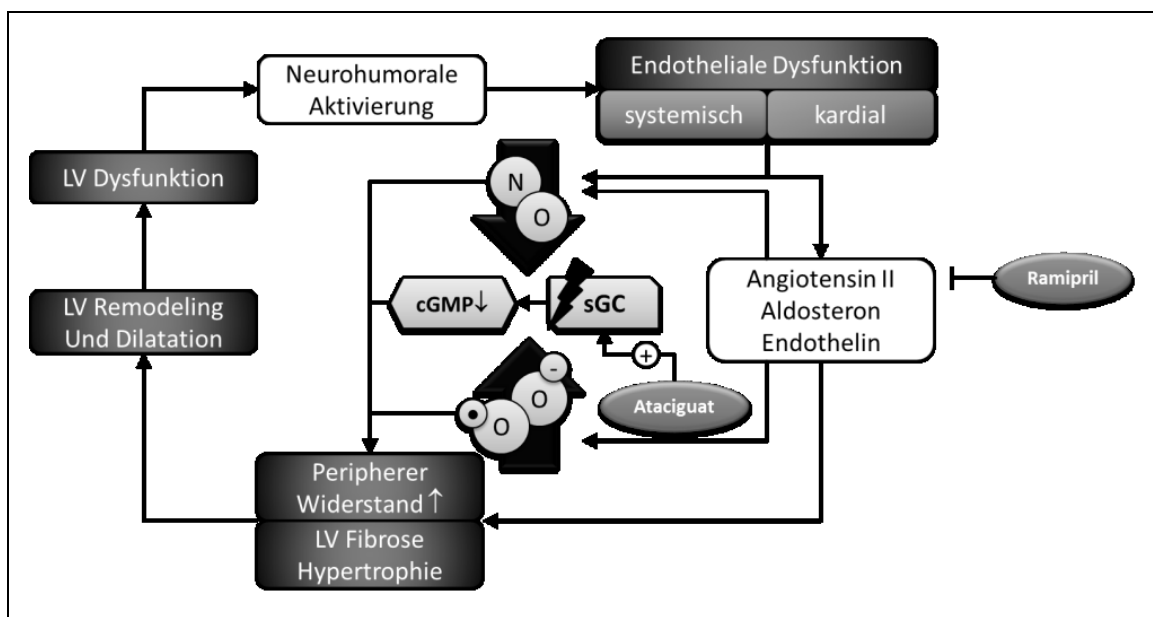


Abbildung 4.1: Zusammenhang zwischen Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, NO/sGC/cGMP-Signalweg und NO/Superoxidgleichgewicht sowie deren Auswirkungen auf die linksventrikuläre und endotheliale Funktion nach Myokardinfarkt. Durch den Anstieg von Angiotensin II und anderen Mediatoren kommt es zur Verminderung der NO-Bioverfügbarkeit und Erhöhung der Superoxidanionenkonzentration im Gewebe. Beides bewirkt die Störung des NO/sGC/cGMP-Signalweges. Die Folge sind Erhöhung des peripheren Gefäßwiderstandes und kardiales Remodeling, endotheliale Fehlfunktion und Verstärkung der linksventrikulären Dysfunktion, wodurch die Aktivierung der neurohumoralen Systeme aufrechterhalten wird. Ein Circulus vitiosus stellt sich ein. Ramipril hemmt die Entstehung von Angiotensin II, Ataciguat aktiviert die sGC NO-unabhängig. Nach Bauersachs und Ertl [53].

Ramipril hemmt die Entstehung von Angiotensin II (AT II) durch Blockade des Angiotensin-Converting-Enzyms. Allerdings gibt es zum einen Hinweise, dass AT II auch ACE-unabhängig gebildet wird, zum anderen wurde das Phänomen des „angiotensin escape“ beobachtet, d.h. bei chronischer Anwendung eines ACE-Hemmers erhöht sich im Verlauf die AT II-Konzentration wieder [14]. Einer der Gründe hierfür ist, dass die Hemmung des Angiotensin-Converting-Enzyms im Verlauf zur Erhöhung der Chymaseaktivität im kardialen Interstitium führt, welche ebenfalls wie das ACE in der Lage ist, Angiotensin I in aktives Angiotensin II zu überführen [54]. Daher sind in der Postinfarkt- und Herzinsuffizienztherapie schon lange Kombinationstherapien etabliert, etwa durch Zugabe von Aldosteronantagonisten [1, 43, 55]. Sogar eine Tripeltherapie aus ACE-Hemmer, AT1-Blocker und Aldosteronantagonist wurde diskutiert [56]. All diese Substanzen blockieren das RAAS, die NO-Bioverfügbarkeit bleibt aber weiterhin reduziert und die Mortalität nach Infarkt hoch, sodass es sinnvoll ist, auch andere Angriffspunkte im circulus vitiosus zu nutzen. Mit Atacigat lassen sich die negativen Effekte durch verminderte NO-Bioverfügbarkeit umgehen, da es die positiven Effekte von NO von diesem unabhängig durch direkte Aktivierung der sGC vermittelt und damit auf völlig anderem Wege in die Pathophysiologie nach Herzinsuffizienz eingreift. Dies könnte den additiven Effekt der Kombinationstherapie mit erklären. Keines der beiden Therapeutika war in einem unserer Ergebnisse dem anderen deutlich über- oder unterlegen. Der Effekt war immer gleichwertig, eine ergänzende Wirkung also nicht offensichtlich abzuleiten. Betrachtet man aber die Ergebnisse der Microarray-Analyse, kann man Interessantes schlussfolgern. Vergleicht man die in den verschiedenen Gruppen signifikant herauf- oder herunterregulierten Gene miteinander, so fand sich beim Vergleich zwischen den beiden Monotherapiegruppen kein einziges Gen, das sowohl in der einen, als auch in der anderen Gruppe hochreguliert war. Das bedeutet, dass Atacigat ganz andere Gene reguliert hat als Ramipril, was wieder bestärkt, dass es an ganz anderen Punkten der Pathophysiologie angreift als Ramipril, dadurch aber vergleichbare Effekte erzielt. Außerdem fanden wir in der HMR+R-Gruppe 18 Gene, die ausschließlich nur heraufreguliert wurden, wenn Atacigat und Ramipril zusammen gegeben wurden.

Dies liefert den stärksten Hinweis für einen tatsächlichen additiven Effekt, wie er sich auch in den hämodynamischen Messungen, den Messungen zu Ventrikelstruktur und -geometrie bzw. zur Bildung von oxidativem Stress darstellte.

NO spielt auch bei der Entstehung der endothelialen Dysfunktion nach Myokardinfarkt eine wichtige Rolle [3]. Ataciguat nimmt darauf positiven Einfluss, verbessert die endotheliale Funktion und senkt den peripheren Widerstand [35]. Die Senkung der AT-II- und Aldosteronspiegel über Ramipril führt ebenfalls zur Senkung des peripheren Widerstandes und zur Entlastung des Herzens [14], möglicherweise ist dies ein weiterer Grund für den additiven Effekt. Beide Substanzen regulieren auch Enzyme, die im Rahmen von oxidativem Stress eine Rolle spielen, UCP3 und gp91phox.

4.3 Oxidativer Stress als aggravierender Faktor bei ventrikulärem Remodeling nach Myokardinfarkt

Oxidativer Stress beschreibt das Missverhältnis zwischen protektiv wirkenden Antioxidantien und hochreaktiven Sauerstoffgruppen (reactive oxygen species, ROS) im Gewebe [57]. Hochreaktiv sind sie deshalb, weil sie über mindestens ein unpaares Elektron verfügen. Die Wichtigsten für die Pathophysiologie nach Herzinfarkt sind hierbei die Superoxidanionen ($O_2^{\cdot-}$), die auch beim gesunden Menschen in geringem Maße im Gewebe anfallen. So entstehen z.B. geringe Mengen Superoxidanionen ($O_2^{\cdot-}$) physiologisch als Beiprodukt der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien beim aeroben Stoffwechsel des Herzens, und tatsächlich wiesen selbst unsere scheinoperierten, gesunden Versuchstiere geringe basale Spiegel von Superoxidanionen in den aus dem linken Ventrikel isolierten Mitochondrien auf. Wenn ROS aber in großer Menge vorhanden sind, können sie DNA, Zellmembranen und Proteine direkt toxisch schädigen [58]. Eine verstärkte ROS-Produktion im endothelialen Gewebe, v.a. von $O_2^{\cdot-}$, fand sich in zahlreichen Studien nach experimentellem Myokardinfarkt und bei linksventrikulärer Dysfunktion [28, 59-61]. Unter diesen pathologischen Bedingungen können hochreaktive Sauerstoffgruppen als

Antwort auf Wachstumsfaktoren, Hormone und Zytokine auch in geringerer Konzentration über sogenanntes „redox-signalling“ subtil verschiedene Signaltransduktionswege beeinflussen und somit zur Hypertrophie und Fibrose im Rahmen des kardialen Remodelings sowie zur kontraktilen Dysfunktion beitragen [27, 62, 63]. Des Weiteren beeinflussen ROS direkt die NO-Bioverfügbarkeit, indem sie durch hohe Affinität zu NO mit diesem reagieren und das hochreaktive Peroxynitrit (ONOO^-) bilden. Abbildung 4.2 fasst die Effekte von oxidativem Stress auf das kardiovaskuläre System zusammen:

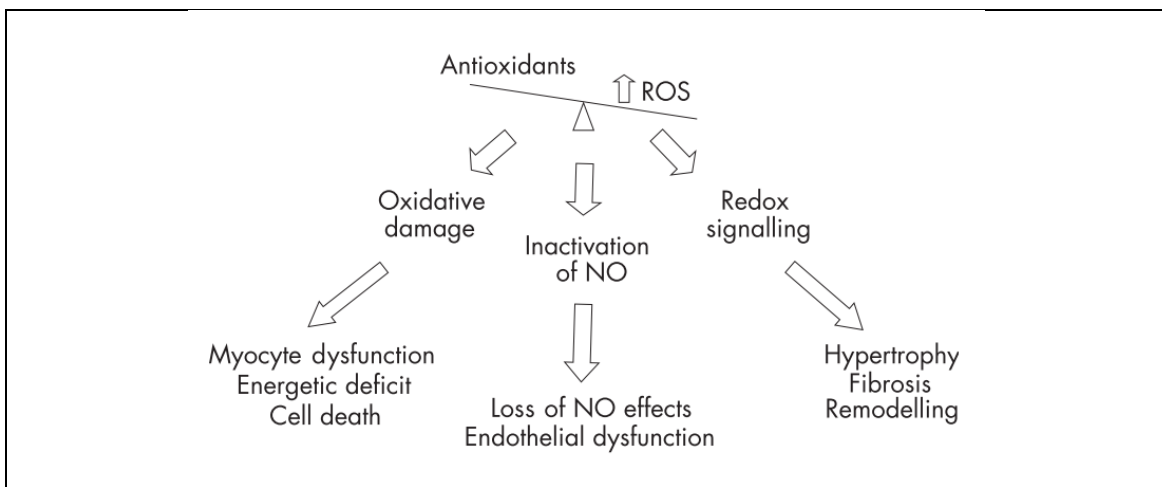


Abbildung 4.2: Oxidativer Stress bedeutet das Ungleichgewicht zwischen hochreaktiven Sauerstoffgruppen und Antioxidantien und führt zu direkter Zellschädigung, Inaktivierung von NO und subtiler Beeinflussung zahlreicher Signaltransduktionswege unter pathologischen Bedingungen, wie sie nach Myokardinfarkt vorliegen. Dadurch trägt oxidativer Stress zur kontraktilen Dysfunktion, Apoptose, Hypertrophie und Fibrose bei und beeinflusst indirekt über mangelnde NO-Bioverfügbarkeit die endotheliale Funktion. Nach Seddon et al. [27].

Die Tiere, die nur Placebo erhielten, wiesen deutlich erhöhte Werte für die Superoxidanionenkonzentration im kardialen Gewebe gegenüber Sham auf. Es gibt mehrere Quellen, die zu dieser hohen Konzentration von O_2^- im Gewebe der Tiere beigetragen haben könnten. Hierzu gehört z.B. die eNOS, die unter physiologischen Bedingungen als Dimer vorliegt und NO produziert. Unter den pathologischen Bedingungen nach Myokardinfarkt kann es, etwa durch Reaktion des Kofaktors Tetrahydro-L-biopterin (BH_4) mit Peroxynitrit zur eNOS-Entkopplung kommen, woraufhin das Enzym anstatt NO Superoxidanionen produziert und damit nicht nur die NO-Bioverfügbarkeit sinkt, sondern auch der oxidative Stress im Gewebe steigt. Förstermann und Münzel sowie Verhaar et al. berichten ausführlich darüber [30, 64].

Zwei weitere wichtige Quellen für die Entstehung von Superoxidanionen im kardialen Gewebe wurden sowohl durch Ataciguat als auch durch Ramipril besonders beeinflusst: Die Mitochondrien des linken Ventrikels und die sogenannten NADPH-Oxidase (NOX).

Die Mitochondrien stehen im Zentrum des aeroben Stoffwechsels der Kardiomyozyten, indem sie den Sauerstoffverbrauch der Zellen im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung an die Synthese von energielieferndem ATP koppeln. Dies geschieht durch Aufbau eines elektrochemischen Protonengradienten über die mitochondriale Membran [65], indem Elektronen über verschiedene Redoxsysteme der Atmungskette transportiert werden und Protonen generiert werden, die aktiv über die innere mitochondriale Membran gepumpt werden. Hierbei kann es zum sogenannten „Elektronenleck“ kommen, d.h. Elektronen lösen sich vom Weitertransport und reagieren direkt mit Sauerstoff zu Superoxidanionen. Daher gelten die Mitochondrien, wie bereits oben erwähnt, als eine der Hauptquellen für schädliche hochreaktive Sauerstoffgruppen im kardialen Gewebe [66, 67] und tragen zur Progression des linksventrikulären Remodelings bei [68, 69].

Der myokardiale Sauerstoffverbrauch ist proportional zur Ventrikel-Wandspannung und diese wiederum korreliert positiv mit der Ventrikelgröße [49]. Im Gewebe eines dilatierten, hypertrophierten Ventrikels mit hohem Bedarf an Sauerstoff müsste daher in den Mitochondrien besonders viel Superoxid anfallen. Dies deckt sich mit unseren Ergebnissen und denen anderer Studien [28, 70]. Tiere mit Monotherapie, die in beiden Gruppen gleichwertig hochsignifikant niedrigere Werte für mitochondriales Superoxid als in der Placebogruppe hatten, wiesen auch gegenüber dieser Gruppe einen geringeren Ventrikeldurchmesser und Myozytenquerschnitt in unserer Studie auf. Die Kombinationstherapie senkte all diese Parameter noch zusätzlich. Auf der einen Seite könnte so die verminderte Ventrikelwandspannung bei therapierten Tieren einer der Gründe sein, warum in deren kardialen Gewebe weniger mitochondriales Superoxid gemessen wurde, auf der anderen Seite könnten jedoch durch HMR und Ramipril auch Enzyme beeinflusst worden sein, die eine Verminderung der ROS-

Produktion in den Mitochondrien bewirken, wodurch weniger O_2^- für pathologische Signalwege zur Verfügung steht. Dies würde dann bedeuten, dass umgekehrt durch die verminderte ROS-Produktion eine starke Ventrikelhypertrophie, -dilatation und -fibrose ausgeblieben ist.

In der Tat fand sich unter den durch HMR und Ramipril regulierten Genen eines, das für ein in den Mitochondrien lokalisiertes Enzym namens UCP3 (engl. „uncoupling proteine 3“) codiert, welches seit einiger Zeit in Verdacht steht, durch sogenanntes „mildes Entkoppeln“ (engl. „mild uncoupling“) die Superoxidanionen-Produktion in den Mitochondrien zu drosseln [65, 71]. Der Mechanismus der „Entkopplung“, ist schon lange bekannt zur Wärmegewinnung im braunen Fettgewebe [72]. Dabei kommt es zum sogenannten „Protonenleck“, d.h. Protonen driften wieder über die mitochondriale Membran zurück, ohne dass es dabei zur ATP-Bildung kommt [65, 67, 71]. Dies mindert den Protonengradienten über der Membran und damit das Membranpotential. In mehreren Publikationen wird postuliert, dass die Produktionsrate an Superoxidanionen direkt mit der Höhe des Membranpotentials korreliert [67, 73, 74]. Miwa et al. bestätigten dies 2003 in einer Studie an Mitochondrien von *Drosophila melanogaster*. Bei Zugabe des Entkopplers Carbonyl cyanid-p-Trifluoromethoxyphenylhydrazon (FCCP) in verschiedenen Konzentrationen zu den Mitochondrien senkte sich jeweils sowohl deren Membranpotential als auch deren ROS-Produktion [75]. Eine Senkung dieses Potentials durch mildes Entkoppeln könnte also einen Schutzmechanismus vor übermäßiger ROS-Produktion darstellen. In unseren Ergebnissen fanden wir in der Placebogruppe verminderte Werte von UCP3 gegenüber den scheinoperierten Tieren, die in den Gruppen für Ataciguat und Ramipril bzw. der Kombination von normaler Höhe waren, was sich auch im Anstieg der Proteinkonzentration für UCP3 in diesen Gruppen gegenüber Placebo widerspiegelte. Der therapeutische Effekt von Ataciguat und Ramipril scheint also unter anderem eine Folge der Erhöhung der UCP3-Konzentration in den Mitochondrien sein. Dazu passt nach obigen Postulaten die entsprechende Senkung der mitochondrialen Superoxidanionen-Produktion, die wir gemessen haben. Toime et al. lieferten kürzlich in einer Studie mit isolierten Mitochondrien aus Skelettmuskulatur von Wildtyp- und

UCP3^{-/-}-Knockout-Mäusen zusätzlichen Beleg, dass UCP3 die mitochondriale ROS-Produktion vermindert. Zudem verglichen sie den bereits von Miwa et al. [75] eingesetzten chemischen Entkoppler FCCP mit der Wirkung von UCP3 und fanden, dass UCP3 auf ähnliche Weise wie FCCP über Senkung des Membranpotentials seine ROS-mindernden Effekte erzielt, aber sich möglicherweise noch weitreichenderen Mechanismen bedient [71]. Trotz der zahlreichen vielversprechenden Resultate zu UCP3 wird dessen Rolle im Zusammenhang mit Herzinsuffizienz noch kontrovers diskutiert. Murray et al. sahen bei ihren Tieren zehn Wochen nach Myokardinfarkt im Gegensatz zu unseren Ergebnissen eine Zunahme von UCP3 bei untherapierten, herzinsuffizienten Tieren und assoziierten diese Zunahme mit einem schlechteren Energiemetabolismus im kardialen Gewebe [76]. Bugger et al. dagegen fanden entsprechend unseren Ergebnissen einen Abfall der UCP3-Proteinexpression in Rattenherzen nach Doxorubicin-induzierter Herzinsuffizienz mit konsekutiv verstärkter ROS-Produktion, bestätigten jedoch auch die bessere Verwertung von Sauerstoff zur ATP-Synthese in insuffizienten Herzen mit niedrigen UCP3-Spiegeln. Die ambivalente Rolle von UCP3 gibt daher großen Anlass für weitere Untersuchungen.

Im Verhältnis zu Placebo konnte die mitochondriale O₂⁻-Produktion durch die Therapien nicht so stark gesenkt werden wie die Gesamtmenge an Superoxidanionen im kardialen Gewebe. Es muss also noch weitere ROS-Quellen geben, die durch Ataciguat und Ramipril beeinflusst wurden.

Von zunehmender Bedeutung als Quelle für hochreaktive Sauerstoffgruppen, die Einfluss auf das kardiale Remodeling nehmen, ist die Familie der NADPH-Oxidasen (NOX). Dies sind Enzyme, bestehend aus einem Komplex verschiedener Untereinheiten, die zuallererst in Neutrophilen gefunden wurden (NOX of phagocytes = Phox) und deren Primärfunktion, auch unter physiologischen Bedingungen, die Bildung von Superoxid unter Umwandlung von NADPH zu NADP⁺ ist. Hierfür beinhalten sie unter anderem zwei Häm-Domänen, die abwechselnd oxidiert bzw. reduziert werden [77]. Eine Isoform dieser NADPH-Oxidasen, NOX2 bzw. auch gp91phox genannt, findet sich zusätzlich auch in Kardiomyozyten, Endothelzellen und

Fibroblasten [78]. Ihre Stimulation erfolgt durch Wanddehnungsstress des Ventrikels, durch verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine und auch durch Angiotensin II [3, 49, 79]. Daraufhin vermitteln die gebildeten ROS ihre Effekte über die Aktivierung von Proteinkinasen und Modulation von verschiedenen Transkriptionsfaktoren [80]. Die Folgen sind mitochondriale Dysfunktion bis hin zum Zelltod [78, 81-83], kardiale Hypertrophie [84-86] und Stimulation der Kollagensynthese [87, 88], Modulation der Kalziumkonzentration in der Zelle und konsekutive kontraktile Dysfunktion [89, 90] des Myokards (Siehe Abbildung 4.3).

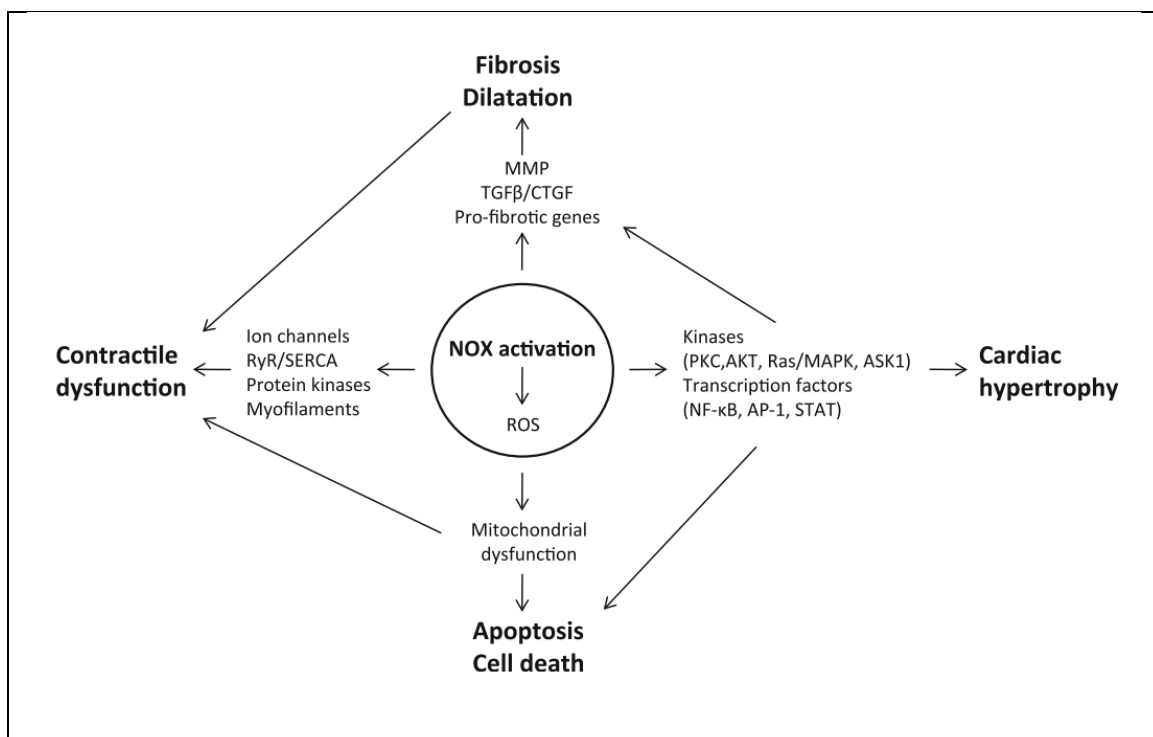


Abbildung 4.3: Einfluss der ROS-Bildung durch NADPH-Oxidase auf das kardiale Remodelling. Durch die Superoxidanionen kommt es zur Beeinflussung verschiedener Proteinkinasen, Wachstumsfaktoren, Signaltransduktionsrezeptoren und Transkriptionsfaktoren mit konsekutiver kardialer Hypertrophie und Dilatation, Fibrose, Zellapoptose und kontraktile Dysfunktion. RyR = Ryanodinrezeptor, SERCA = Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} ATPase, MMP = Matrix-Metalloproteinase, CTGF = Connective Tissue Growth Factor, TGFβ = Transforming Growth Factor β. Nach Nabeebaccus et al. [78].

Eine Besonderheit der NADPH-Oxidase ist, dass die von ihnen produzierten reaktiven Sauerstoffgruppen die Produktion weiterer ROS durch andere Systeme vorantreiben [27, 91]. So sind die Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) und die myokardiale NO-Produktion bei linksventrikulärer Dysfunktion z.B. deshalb herabgesetzt [3, 24, 92], weil die von den NADPH-Oxidase gebildeten Superoxidanionen eine große Affinität zu

Stickstoffmonoxid haben und dadurch mit NO zum hochreaktiven Peroxynitrit (ONOO⁻) reagieren [3, 93]. Dies führt weiterhin, wie bereits beschrieben, zur Entkopplung der eNOS, die daraufhin ebenfalls statt NO Superoxidanionen bildet. Die NADPH-Oxidasen spielen also eine erhebliche Rolle bei der Akkumulation von schädlichen Sauerstoffgruppen im Myokard.

In unserer Studie fanden wir die NOX-Isoform gp91phox bei den Tieren, die Placebo erhielten, gegenüber den scheinoperierten Tieren signifikant erhöht. Entsprechend fanden sich auch deutlich erhöhte Werte für die kardiale Superoxidanionen-Produktion. Diese Ergebnisse sind konform mit denen, die Fukui et al. 2001 in ihrer Studie zur Erforschung der gp91phox-Expression bei Ratten mit Myokardinfarkt erhielten [94]. Zhao et al. bestätigten dies gleichermaßen in einer Studie an Wildtyp-Mäusen und gp91phox-Knockout-Mäusen. Die Wildtyp-Mäuse wiesen nach Infarkt im Vergleich zu Mäusen ohne Infarkt eine erhöhte Genexpression von gp91phox auf [95]. Ataciguat und Ramipril senkten gleichermaßen die Proteinexpression der NOX2 so weit, dass die Werte mit denen der scheinoperierten Tiere vergleichbar waren. Entsprechend verhielt es sich auch hier mit der kardialen Superoxidanionen-Produktion. Heymes et al. konnten am insuffizienten menschlichen Herzen ebenfalls eine erhöhte Genexpression von gp91phox nachweisen [96]. Wie bereits erwähnt, gilt Angiotensin II (AT-II) als eine der Komponenten, die die Expression von gp91phox hochregulieren [49, 82, 88]. Es ist also zu vermuten, dass Ramipril durch Blockade der AT-II-Bildung Auswirkungen auf die Genexpression hat. In welcher Weise Ataciguat auf die Expression der gp91phox Einfluss nimmt, kann in dieser Studie nicht abschließend geklärt werden. Da die Kombination aus Ramipril und Ataciguat jedoch eine zusätzliche Senkung der Expression gegenüber den Monotherapien bewirken konnte, ist möglich, dass Ataciguat additiv über einen anderen Mechanismus darauf einwirkt als Ramipril. Außerdem zeigte eine vorhergehende Studie zum Phosphodiesterase-5-Inhibitor (PDE5-Inhibitor) Sildenafil an diabetischen Ratten, dass dieser in deren Aorta ebenfalls eine Senkung der Genexpression von gp91phox bewirkt [97]. PDE5 ist der natürliche Gegenspieler von cGMP, welches durch die sGC gebildet wird. Eine Hemmung der PDE5 bewirkt also ebenso eine cGMP-Erhöhung wie eine verstärkte Aktivierung der

sGC. Ataciguat als sGC-Aktivator könnte also tatsächlich über die vermehrte Bildung von cGMP zur Senkung der Genexpression beigetragen haben.

Die Rolle von gp91phox in der Pathogenese des linksventrikulären Remodelings ist jedoch noch nicht abschließend geklärt. Arbeiten mit gp91phox-Knockout-Mäusen zeigten z.B. überraschende Ergebnisse. Untersuchungen in unserem Labor ergaben bei gezielter Deletion von gp91phox keinen Effekt auf das Remodeling nach Myokardinfarkt [98]. Zhao et al veröffentlichen kürzlich vergleichbare Ergebnisse, fanden aber als mögliche Ursache im Gegenzug zur gp91phox-Deletion andere NOX-Isoformen nach Myokardinfarkt hochreguliert [95]. Da unsere Therapie mit Ataciguat und Ramipril definitiv zu einer Verminderung der ROS-Produktion und Beeinflussung des Remodelings im kardialen Gewebe geführt hat, erhärtet sich der Verdacht, dass die Substanzen zusätzlich zu gp91phox verschiedene andere ROS-Quellen beeinflussen, wie eben z.B. zusätzlich die mitochondriale ROS-Produktion und möglicherweise auch die Expression anderer NOX-Isoformen.

Diese Studie ist die erste, die die Wirkungen von Ataciguat auf das kardiale Remodeling nach Myokardinfarkt untersucht hat und diese mit den Wirkungen eines ACE-Hemmers verglichen hat. Die positiven Effekte, die wir vor allem durch die Kombinationstherapie gesehen haben, auch in Zusammenhang mit oxidativem Stress, der in den letzten Jahren so stark an Bedeutung für die Pathophysiologie der Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt gewonnen hat, machen diese Therapie zu einer äußerst interessanten Option für die Behandlung der Herzinsuffizienz in der Zukunft.

5 Zusammenfassung

Die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (sGC) durch Stickstoffmonoxid (NO) ist ein zentraler Mechanismus im NO/sGC/cGMP-Signalweg. Beim Syndrom der chronischen Herzinsuffizienz ist die Signalübertragung durch NO jedoch gestört. Daher untersuchten wir die Effekte des NO-unabhängigen sGC-Aktivators Ataciguat-Natrium (vormals HMR1766) auf Hämodynamik und linksventrikuläres Remodeling in der Postinfarktphase bei Ratten, alleine und in Kombination mit dem ACE-Hemmer Ramipril.

10 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt wurden die Tiere für 9 Wochen über eine Sonde entweder mit Placebo, Ataciguat (10 mg/kg, zweimal täglich), Ramipril (1 mg/kg/Tag) oder einer Kombination aus beidem gefüttert. Die Infarktgröße war in allen Gruppen vergleichbar. Die Monotherapie mit Ataciguat bzw. Ramipril verbesserte die linksventrikuläre Funktion und führte zu einem geringeren Anstieg des linksventrikulären Füllungsdruckes (LVEDP) und -volumens (LVEDV) im Vergleich zu Placebo. Die Kombinationstherapie war den Monotherapien überlegen. Weiterhin konnten sowohl die Ventrikelkontraktilität ($LV \text{ dP/dt}_{\text{max}}/IP$), als auch -relaxationsfähigkeit ($LV \text{ dP/dt}_{\text{min}}$) verbessert werden und die Lungenflüssigkeit sowie die rechtsventrikuläre Hypertrophie signifikant durch die Monotherapien, bzw. noch weiter durch die Kombination gesenkt werden. Die in der Placebo-Gruppe erhöhten Werte für Myozytenquerschnitt und interstitielle Fibrose waren in der Ramipril- und Ataciguat-Gruppe signifikant und in der Kombination noch weiter vermindert. Zusätzlich konnte auch der Superoxidanionenspiegel im kardialen Gewebe am besten durch die Kombinationstherapie gesenkt werden. Dabei zeigte sich eine Beeinflussung der NADPH-Oxidase-Untereinheit gp91phox und des mitochondrialen Enzyms UCP3.

Eine Langzeitbehandlung mit Ataciguat verbesserte also die linksventrikuläre Dysfunktion und das kardiale Remodeling bei Ratten nach Myokardinfarkt in vergleichbarem Ausmaß wie die Therapie mit Ramipril. Die Kombination aus Ataciguat und ACE-Hemmer war jedoch wesentlich effektiver. Folglich stellt die sGC-Aktivierung einen vielversprechenden Therapieansatz zur Prävention von kardialem Remodeling und Herzinsuffizienz nach Herzinfarkt dar.

6 Literaturverzeichnis

1. McMurray, J. J. V. (2010) Clinical practice. Systolic heart failure, *N Engl J Med* 362, 228-38.
2. Ho, K. K., Pinsky, J. L., Kannel, W. B., et al. (1993) The epidemiology of heart failure: the Framingham Study, *J Am Coll Cardiol* 22, 6A-13A.
3. Bauersachs, J. & Widder, J. D. (2008) Endothelial dysfunction in heart failure, *Pharmacol Rep* 60, 119-126.
4. Henkel, D. M., Redfield, M. M., Weston, S. a, et al. (2008) Death in heart failure: a community perspective, *Circ Heart Fail* 1, 91-7.
5. Lip, G. Y., Gibbs, C. R. & Beevers, D. G. (2000) ABC of heart failure: aetiology, *BMJ* 320, 104-7.
6. Sutton, M. G. & Sharpe, N. (2000) Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy, *Circulation* 101, 2981-8.
7. Cohn, J. N., Ferrari, R. & Sharpe, N. (2000) Cardiac remodeling—concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling, *J Am Coll Cardiol* 35, 569-82.
8. Jessup, M. & Brozena, S. (2003) Heart failure, *N Engl J Med* 348, 2007-18.
9. Ertl, G. & Frantz, S. (2005) Healing after myocardial infarction, *Cardiovasc Res* 66, 22-32.
10. Cleutjens, J. P., Kandala, J. C., Guarda, E., et al. (1995) Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction, *J Mol Cell Cardiol* 27, 1281-92.
11. Anversa, P., Beghi, C., Kikkawa, Y., et al. (1985) Myocardial response to infarction in the rat. Morphometric measurement of infarct size and myocyte cellular hypertrophy, *Am J Cardiol* 118, 484-92.
12. Gaudron, P., Kugler, I., Hu, K., et al. (2001) Time course of cardiac structural, functional and electrical changes in asymptomatic patients after myocardial infarction: their inter-relation and prognostic impact, *J Am Coll Cardiol* 38, 33-40.

13. Zaman, M. A., Oparil, S. & Calhoun, D. a. (2002) Drugs targeting the renin-angiotensin-aldosterone system, *Nat Rev Drug Discov* 1, 621-36.
14. Dzau, V. J., Bernstein, K., Celermajer, D., et al. (2002) Pathophysiologic and therapeutic importance of tissue ACE: a consensus report, *Cardiovasc Drugs Ther* 16, 149-60.
15. Yamazaki, T., Komuro, I., Kudoh, S., et al. (1995) Angiotensin II partly mediates mechanical stress-induced cardiac hypertrophy, *Circ Res* 77, 258-65.
16. Bogoyevitch, M. A., Glennon, P. E., Andersson, M. B., et al. (1994) Endothelin-1 and fibroblast growth factors stimulate the mitogen-activated protein kinase signaling cascade in cardiac myocytes. The potential role of the cascade in the integration of two signaling pathways leading to myocyte hypertrophy, *J Biol Chem* 269, 1110-9.
17. Sadoshima, J. & Izumo, S. (1993) Molecular characterization of angiotensin II--induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype, *Circ Res* 73, 413-23.
18. Schafer, A., Fraccarollo, D., Tas, P., et al. (2004) Endothelial dysfunction in congestive heart failure: ACE inhibition vs. angiotensin II antagonism, *Eur J Heart Fail* 6, 151-159.
19. Ertl, G., Schorb, W., Gaudron, P., et al. (1996) Effect of the cardiac renin-angiotensin system on hypertrophy, *Z Kardiol* 85 Suppl 6, 233-40.
20. Greenberg, B., Quinones, M. A., Koilpillai, C., et al. (1995) Effects of long-term enalapril therapy on cardiac structure and function in patients with left ventricular dysfunction: results of the SOLVD echocardiography substudy, *Circulation. Am Heart Assoc* 91, 2573.
21. Landmesser, U., Wollert, K. C. & Drexler, H. (2009) Potential novel pharmacological therapies for myocardial remodelling, *Cardiovasc Res* 81, 519-27.
22. Fraccarollo, D., Widder, J. D., Galuppo, P., et al. (2008) Improvement in left ventricular remodeling by the endothelial nitric oxide synthase enhancer AVE9488 after experimental myocardial infarction, *Circulation* 118, 818-827.
23. Frantz, S., Adamek, A., Fraccarollo, D., et al. (2009) The eNOS enhancer AVE 9488: a novel cardioprotectant against ischemia reperfusion injury, *Basic Res Cardiol*.

24. Prabhu, S. D. (2004) Nitric oxide protects against pathological ventricular remodeling: reconsideration of the role of NO in the failing heart., *Circ Res* 94, 1155-7.
25. Feng, Q. (2002) Development of heart failure and congenital septal defects in mice lacking endothelial nitric oxide synthase, *Circulation* 106, 873-879.
26. Evgenov, O. V., Pacher, P., Schmidt, P. M., et al. (2006) NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential, *Nat Rev Drug Discov* 5, 755-68.
27. Seddon, M., Looi, Y. H. & Shah, A. M. (2007) Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure, *Br Heart J* 93, 903-7.
28. Fraccarollo, D., Berger, S., Galuppo, P., et al. (2011) Deletion of cardiomyocyte mineralocorticoid receptor ameliorates adverse remodeling after myocardial infarction, *Circulation* 123, 400-8.
29. Münzel, T., Daiber, A. & Mülsch, A. (2005) Explaining the phenomenon of nitrate tolerance, *Circ Res* 97, 618-28.
30. Förstermann, U. & Münzel, T. (2006) Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace, *Circulation* 113, 1708-14.
31. Ko, F. N., Wu, C. C., Kuo, S. C., et al. (1994) YC-1, a novel activator of platelet guanylate cyclase, *Blood* 84, 4226-33.
32. Schindler, U., Strobel, H., Schönafinger, K., et al. (2006) Biochemistry and pharmacology of novel anthranilic acid derivatives activating heme-oxidized soluble guanylyl cyclase, *Mol Pharmacol. ASPET* 69, 1260.
33. Schäfer, A., Galuppo, P., Fraccarollo, D., et al. (2010) Increased cytochrome P4502E1 expression and altered hydroxyeicosatetraenoic acid formation mediate diabetic vascular dysfunction: rescue by guanylyl-cyclase activation, *Diabetes* 59, 2001-9.
34. Schäfer, A., Flierl, U., Kobsar, A., et al. (2006) Soluble guanylyl cyclase activation with HMR1766 attenuates platelet activation in diabetic rats, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 2813-8.
35. Schäfer, A., Fraccarollo, D., Werner, L., et al. (2010) Guanylyl cyclase activator ataciguat improves vascular function and reduces platelet activation in heart failure, *Pharmacol Res* 62, 432-8.
36. Whittaker, P., Boughner, D. R. & Kloner, R. A. (1991) Role of collagen in acute myocardial infarct expansion, *Circulation* 84, 2123-34.

37. Zhao, H., Kalivendi, S., Zhang, H., et al. (2003) Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide, *Free Radic Biol Med* 34, 1359-68.
38. Zielonka, J., Vasquez-Vivar, J. & Kalyanaraman, B. (2006) The confounding effects of light, sonication, and Mn (III) TBAP on quantitation of superoxide using hydroethidine, *Free Radic Biol Med* 41, 1050 - 1057.
39. Zhao, H., Joseph, J., Fales, H. M., et al. (2005) Detection and characterization of the product of hydroethidine and intracellular superoxide by HPLC and limitations of fluorescence, *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 102, 5727-32.
40. Fink, B., Laude, K., McCann, L., et al. (2004) Detection of intracellular superoxide formation in endothelial cells and intact tissues using dihydroethidium and an HPLC-based assay, *Am J Physiol Cell Physiol* 287, C895-902.
41. Jacob, R., Gulch, R., Kissling, G., et al. (1973) Muscle physiology as a basis for the evaluation of heart capacity, *Z Gesamte Inn Med* 28, 1-11.
42. French, B. A. & Kramer, C. M. (2007) Mechanisms of post-infarct left ventricular remodeling, *Drug Discov Today Dis Mech* 4, 185-196.
43. Fraccarollo, D., Galuppo, P., Hildemann, S., et al. (2003) Additive improvement of left ventricular remodeling and neurohormonal activation by aldosterone receptor blockade with eplerenone and ACE inhibition in rats with myocardial infarction, *J Am Coll Cardiol* 42, 1666-1673.
44. Fraccarollo, D., Galuppo, P., Schmidt, I., et al. (2005) Additive amelioration of left ventricular remodeling and molecular alterations by combined aldosterone and angiotensin receptor blockade after myocardial infarction., *Cardiovasc Res* 67, 97-105.
45. Boerrigter, G. & Burnett Jr., J. C. (2007) Nitric oxide-independent stimulation of soluble guanylate cyclase with BAY 41-2272 in cardiovascular disease, *Cardiovasc Drug Rev* 25, 30-45.
46. Cerra, M. C. & Pellegrino, D. (2007) Cardiovascular cGMP-generating systems in physiological and pathological conditions, *Curr Med Chem* 14, 585-99.
47. Pfeffer, M. A., Pfeffer, J. M., Fishbein, M. C., et al. (1979) Myocardial infarct size and ventricular function in rats, *Circ Res* 44, 503-12.
48. Weber, K. T. (1997) Extracellular matrix remodeling in heart failure: a role for de novo angiotensin II generation, *Circulation* 96, 4065-82.

49. Giordano, F. J. (2005) Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure, *J Clin Invest*. Am Soc Clin Investig *115*, 500–508.
50. Khalil, M. E., Basher, A. W., Brown, E. J., et al. (2001) A remarkable medical story: benefits of angiotensin-converting enzyme inhibitors in cardiac patients., *Journal of the American College of Cardiology* *37*, 1757-64.
51. Guazzi, M., Vicenzi, M., Arena, R., et al. (2010) PDE5-inhibition with sildenafil improves left ventricular diastolic function, cardiac geometry and clinical status in patients with stable systolic heart failure: results of a 1-year prospective, randomized, placebo-controlled study, *Circ Heart Fail* *4*, 8-17.
52. Zhou, Z., Pyriochou, A., Kotanidou, A., et al. (2008) Soluble guanylyl cyclase activation by HMR-1766 (ataciguat) in cells exposed to oxidative stress, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* *295*, H1763-71.
53. Bauersachs, J. & Ertl, G. (2006) Kardiovaskuläres Remodeling, in *Molekularmedizinische Grundlagen von para- und autokrinen Regulationsstörungen* [Ganten, D., Ruckpaul, K., and Köhrle, J., Eds.] 3rd ed., pp 335-352. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg.
54. Zablocki, D. & Sadoshima, J. (2010) The one-two punch: knocking out angiotensin II in the heart, *J Clin Invest* *120*, 1028-31.
55. McMurray, J. J. V., Pfeffer, M. A., Swedberg, K., et al. (2004) Which inhibitor of the renin-angiotensin system should be used in chronic heart failure and acute myocardial infarction?, *Circulation* *110*, 3281-8.
56. Werner, C., Pöss, J. & Böhm, M. (2010) Optimal antagonism of the renin-angiotensin-aldosterone system: do we need dual or triple therapy?, *Drugs* *70*, 1215-30.
57. Trachtenberg, B. H. & Hare, J. M. (2009) Biomarkers of oxidative stress in heart failure, *Heart Fail Clin* *5*, 561-77.
58. Murdoch, C. E., Zhang, M., Cave, A. C., et al. (2006) NADPH oxidase-dependent redox signalling in cardiac hypertrophy, remodelling and failure, *Cardiovasc Res* *71*, 208-215.
59. Bauersachs, J., Bouloumie, A., Fraccarollo, D., et al. (1999) Endothelial dysfunction in chronic myocardial infarction despite increased vascular endothelial nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase expression: role of enhanced vascular superoxide production, *Circulation* *100*, 292-298.
60. Bauersachs, J., Fleming, I., Fraccarollo, D., et al. (2001) Prevention of endothelial dysfunction in heart failure by vitamin E: attenuation of vascular superoxide

anion formation and increase in soluble guanylyl cyclase expression, *Cardiovasc Res* 51, 344-350.

61. Arimura, K., Egashira, K., Nakamura, R., et al. (2001) Increased inactivation of nitric oxide is involved in coronary endothelial dysfunction in heart failure, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280, H68-75.
62. Finkel, T. (2003) Oxidant signals and oxidative stress, *Curr Opin Cell Biol* 15, 247-254.
63. Tsutsui, H., Kinugawa, S. & Matsushima, S. (2009) Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in myocardial remodelling, *Cardiovasc Res* 81, 449-56.
64. Verhaar, M. C., Westerweel, P. E., Zonneveld, A. J. van, et al. (2004) Free radical production by dysfunctional eNOS, *Br Heart J* 90, 494-5.
65. Azzu, V., Jastroch, M., Divakaruni, A. S., et al. (2010) The regulation and turnover of mitochondrial uncoupling proteins, *Biochim Biophys Acta*.
66. Ambrosio, G., Zweier, J. L., Duilio, C., et al. (1993) Evidence that mitochondrial respiration is a source of potentially toxic oxygen free radicals in intact rabbit hearts subjected to ischemia and reflow, *J Biol Chem* 268, 18532-41.
67. Brand, M. D., Affourtit, C., Esteves, T. C., et al. (2004) Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins, *Free Radic Biol Med* 37, 755-67.
68. Matsushima, S., Ide, T., Yamato, M., et al. (2006) Overexpression of mitochondrial peroxiredoxin-3 prevents left ventricular remodeling and failure after myocardial infarction in mice, *Circulation* 113, 1779-86.
69. Tsutsui, H., Ide, T. & Kinugawa, S. Mitochondrial oxidative stress, DNA damage, and heart failure, *Antioxid Redox Signal* 8, 1737-44.
70. Bugger, H., Guzman, C., Zechner, C., et al. (2010) Uncoupling protein downregulation in doxorubicin-induced heart failure improves mitochondrial coupling but increases reactive oxygen species generation, *Cancer Chemother Pharmacol*.
71. Toime, L. J. & Brand, M. D. (2010) Uncoupling protein-3 lowers reactive oxygen species production in isolated mitochondria, *Free Radic Biol Med*.
72. Boss, O. (1997) Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression, *FEBS Lett* 408, 39-42.

73. Liu, S. S. (1997) Generating, partitioning, targeting and functioning of superoxide in mitochondria, *Biosc Rep* 17, 259-72.
74. Korshunov, S. (1997) High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria, *FEBS Lett* 416, 15-18.
75. Miwa, S., St-Pierre, J., Partridge, L., et al. (2003) Superoxide and hydrogen peroxide production by Drosophila mitochondria., *Free radical biology & medicine* 35, 938-48.
76. Murray, A. J., Cole, M. A., Lygate, C. A., et al. (2008) Increased mitochondrial uncoupling proteins, respiratory uncoupling and decreased efficiency in the chronically infarcted rat heart, *J Mol Cell Cardiol* 44, 694-700.
77. Akki, A., Zhang, M., Murdoch, C., et al. (2009) NADPH oxidase signaling and cardiac myocyte function, *J Mol Cell Cardiol* 47, 15-22.
78. Nabeebaccus, A., Zhang, M. & Shah, A. M. (2010) NADPH oxidases and cardiac remodelling, *Heart Fail Rev*. Springer Netherlands 16, 5-12-12.
79. Lambeth, J. D. (2004) NOX enzymes and the biology of reactive oxygen, *Nat Rev Immunol* 4, 181-9.
80. Cave, A. C., Brewer, A. C., Narayanapanicker, A., et al. (2006) NADPH oxidases in cardiovascular health and disease, *Antioxid Redox Signal* 8, 691-728.
81. Gilleron, M., Marechal, X., Montaigne, D., et al. (2009) NADPH oxidases participate to doxorubicin-induced cardiac myocyte apoptosis, *Biochem Biophys Res Commun* 388, 727-31.
82. Qin, F., Patel, R., Yan, C., et al. (2006) NADPH oxidase is involved in angiotensin II-induced apoptosis in H9C2 cardiac muscle cells: effects of apocynin, *Free Radic Biol Med* 40, 236-46.
83. Dorn, G. W. (2009) Apoptotic and non-apoptotic programmed cardiomyocyte death in ventricular remodelling, *Cardiovas Res* 81, 465-73.
84. Li, J.-M., Gall, N. P., Grieve, D. J., et al. (2002) Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure, *Hypertension* 40, 477-84.
85. Nakagami, H., Takemoto, M. & Liao, J. K. (2003) NADPH oxidase-derived superoxide anion mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy, *J Mol Cell Cardiol* 35, 851-9.

86. Hingtgen, S. D., Tian, X., Yang, J., et al. (2006) Nox2-containing NADPH oxidase and Akt activation play a key role in angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy, *Physiol Genomics* 26, 180-91.
87. Johar, S., Cave, A. C., Narayanapanicker, A., et al. (2006) Aldosterone mediates angiotensin II-induced interstitial cardiac fibrosis via a Nox2-containing NADPH oxidase, *FASEB J* 20, 1546-8.
88. Bendall, J. K., Cave, A. C., Heymes, C., et al. (2002) Pivotal role of a gp91(phox)-containing NADPH oxidase in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in mice, *Circulation* 105, 293-6.
89. Zima, A. V. & Blatter, L. A. (2006) Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters, *Cardiovasc Res* 71, 310-21.
90. Yano, M., Okuda, S., Oda, T., et al. (2005) Correction of defective interdomain interaction within ryanodine receptor by antioxidant is a new therapeutic strategy against heart failure, *Circulation* 112, 3633-43.
91. Murdoch, C. E., Zhang, M., Cave, A. C., et al. (2006) NADPH oxidase-dependent redox signalling in cardiac hypertrophy, remodelling and failure, *Cardiovasc Res* 71, 208-15.
92. Brutsaert, D. L. (2003) Cardiac endothelial-myocardial signaling: its role in cardiac growth, contractile performance, and rhythmicity, *Physiol Rev* 83, 59-115.
93. Huie, R. E. & Padmaja, S. (1993) The reaction of no with superoxide, *Free Radic Res Commun* 18, 195-9.
94. Fukui, T., Yoshiyama, M., Hanatani, A., et al. (2001) Expression of p22-phox and gp91-phox, essential components of NADPH oxidase, increases after myocardial infarction, *Biochem Biophys Res Commun* 281, 1200-6.
95. Zhao, W., Zhao, D., Yan, R., et al. (2009) Cardiac oxidative stress and remodeling following infarction: role of NADPH oxidase, *Cardiovasc Pathol* 18, 156-66.
96. Heymes, C., Bendall, J. K., Ratajczak, P., et al. (2003) Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure, *J Am Coll Cardiol* 41, 2164-71.
97. Schäfer, A., Fraccarollo, D., Pförtsch, S., et al. (2008) Improvement of vascular function by acute and chronic treatment with the PDE-5 inhibitor sildenafil in experimental diabetes mellitus, *Br J Pharmacol* 153, 886-93.

98. Frantz, S., Brandes, R. P., Hu, K., et al. (2006) Left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice with targeted deletion of the NADPH oxidase subunit gp91PHOX, *Basic Res Cardiol* 101, 127-32.

Danksagung

Zuerst möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Johann Bauersachs für die Überlassung des Themas, die überaus freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die stets zuverlässige Betreuung danken.

Besonders bedanken möchte ich mich außerdem bei Frau Dr. rer. nat. Daniela Fraccarollo und Herrn Dr. rer. nat. Paolo Galuppo für ihre Herzlichkeit und Begeisterungsfähigkeit. Sowohl bei der Durchführung der Versuche, als auch im Anschluss bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse und Anfertigung der schriftlichen Arbeit standen sie mir immer mit gutem Rat zur Seite.

Danken möchte ich auch allen Mitarbeitern und Kollegen des kardiologischen Labors, mit denen ich immer sehr gerne zusammengearbeitet habe sowie meinen Ko-Doktoranden Valentin Hubertus, Lennart Werner und Elena Loch für die gegenseitige Unterstützung und die stets fröhliche Atmosphäre im Labor.

Weiterer Dank gilt insbesondere meinen Eltern, die mir das Medizinstudium und damit die Anfertigung dieser Arbeit erst ermöglichten. Sie und mein lieber Freund Mario schafften es durch ihre unermüdliche Unterstützung immer wieder, mich neu zu motivieren. Vielen lieben Dank dafür!