

Aus der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin B
Direktor: Prof. Dr. med. Stephan B. Felix
der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

**In-vitro Studie zur Charakterisierung des inotropen und lusitropen
Effektes von Stimulatoren und Aktivatoren der löslichen
Guanylatzyklase (sGC) auf isolierte Kardiomyozyten**

Inaugural-Dissertation
zur

Erlangung des akademischen
Grades
Doktor der Medizin
(Dr. med.)

der
Universitätsmedizin
der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität
Greifswald
2014

vorgelegt von:
Isabel Hertrich
geboren am:
18.01.1983
in: Lörrach

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. M. P. Baur

1. Gutachter: Prof. Dr. med. S. Felix

2. Gutachter: Prof. Dr. med. V. Falk

Ort, Raum: Greifswald, Seminarraum Klinik für Innere Medizin B

Tag der Disputation: 30.11.2016

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	5
1.1	Herzinsuffizienz.....	5
1.2	Relaxation des Herzens.....	7
1.3	NO-sGC-cGMP System.....	9
1.3.1	NO.....	9
1.3.2	Effekte von NO auf die Relaxation der Kardiomyozyten.....	10
1.4	Stimulatoren (BAY 41-2272 und BAY 63-2521) und Aktivatoren (BAY 60-2770 und BAY 58-2667) der löslichen Guanylatzyklase.....	11
1.4.1	BAY 41-2272 und BAY 63-2521 (Riociguat).....	11
1.4.2	BAY 60-2770 und BAY 58-2667 (Cinaciguat).....	15
1.5	Fragestellung.....	18
2	Material und Methoden.....	20
2.1	Zellisolation.....	20
2.1.1	Organentnahme.....	20
2.1.2	Prinzip der Langendorff-Anlage.....	21
2.1.3	Anschluss des Herzens an die Langendorff-Anlage.....	23
2.1.4	Perfusion des Herzens.....	24
2.1.5	Isolation und Anfärben.....	24
2.2	Messung der Kontraktion und der Ca ²⁺ -Ratio.....	25
2.3	Aufbereitung der Stimulatoren und Aktivatoren der löslichen Guanylatzyklase und der Kontrollsubstanzen.....	28
2.4	Kontraktilitätsmessung unter Zugabe der Stimulatoren, Aktivatoren und Kontrollsubstanzen.....	30
2.5	cAMP und cGMP Radioimmunoassay.....	31
2.5.1	Prinzip des Radioimmunoassay.....	31
2.5.2	Vorbereitung der Proben.....	32
2.5.3	Durchführung der Radio-Immuno-Assays.....	33
2.6	Proteinbestimmung.....	35
2.6.1	Prinzip der Proteinbestimmung.....	35
2.6.2	Durchführung der Proteinbestimmung.....	35
2.7	Statistische Auswertungen.....	36
3	Ergebnisse.....	37
3.1	Einfluss von Isoproterenol auf die Kontraktilität und Relaxation von isolierten Kardiomyozyten.....	37
3.1.1	Inotropie.....	37
3.1.2	Lusitropie.....	40
3.1.3	Calcium- Transient.....	41
3.2	Einfluss von Verapamil auf die Kontraktilität und Relaxation von isolierten Kardiomyozyten.....	42
3.2.1	Inotropie.....	42
3.2.2	Lusitropie.....	44
3.2.3	Calcium-Transient.....	45
3.3	Einfluss von Diethylamin-Nononate (DEA/NO) auf die Kontraktilität und Relaxation von isolierten Kardiomyozyten.....	46
3.3.1	Inotropie.....	46
3.3.2	Lusitropie.....	47
3.3.3	Calcium-Transient.....	48

3.4	Einfluss von SIN-1 Chlorid auf die Kontraktilität und Relaxation von isolierten Kardiomyozyten.....	49
3.4.1	Inotropie.....	49
3.4.2	Lusitropie.....	51
3.4.3	Calcium-Transient.....	52
3.5	Einfluss von BAY 41-2772 auf die Kontraktilität und Relaxation von isolierten Kardiomyozyten.....	53
3.5.1	Inotropie.....	53
3.5.2	Lusitropie.....	55
3.5.3	Calcium-Transient.....	56
3.6	Einfluss von Riociguat auf die Kontraktilität und Relaxation von isolierten Kardiomyozyten.....	57
3.6.1	Inotropie.....	57
3.6.2	Lusitropie.....	58
3.6.3	Calcium-Transient.....	59
3.7	Einfluss von BAY 60-2770 auf die Kontraktilität und Relaxation von isolierten Kardiomyozyten.....	60
3.7.1	Inotropie.....	60
3.7.2	Lusitropie.....	61
3.7.3	Calcium-Transient.....	62
3.8	Einfluss von Cinaciguat auf die Kontraktilität und Relaxation von isolierten Kardiomyozyten.....	63
3.8.1	Inotropie.....	63
3.8.2	Lusitropie.....	64
3.8.3	Calcium-Transient.....	65
3.9	cGMP und cAMP-Gehalt in den Kardiomyozyten nach Gabe von Riociguat, Cinaciguat, DEA/NO und Isoproterenol.....	66
3.9.1	cAMP.....	66
3.9.2	cGMP.....	67
4	Diskussion.....	68
4.1	Methodendiskussion.....	68
4.2	Positiv inotroper/lusitroper Effekt von Isoproterenol.....	71
4.3	Negativ inotroper/lusitroper Effekt von Verapamil.....	72
4.4	Inotroper und lusitroper Effekt von NO-Donatoren.....	73
4.5	Inotrope und lusitrope Effekte von Riociguat und Cinaciguat.....	77
4.6	Limitationen der Studie.....	83
4.7	Ausblick.....	84
5	Zusammenfassung.....	85
6	Literaturverzeichnis.....	87
7	Anhang.....	116
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	116
7.2	Eidesstattliche Erklärung.....	120
7.3	Danksagung.....	121

1 Einleitung

Die Herzinsuffizienz ist eine der häufigsten Krankheiten der heutigen Zeit und ist unabhängig der Ätiologie mit einer hohen Morbidität und Mortalität verbunden ¹. Aus diesem Grund ist die Suche nach neuen Therapieverfahren zur Verbesserung der Prognose und Symptome erforderlich. Die bisherigen pharmakologischen Behandlungsmöglichkeiten bei chronischer Herzinsuffizienz, die auch eine prognoseverbessernde Wirkung aufweisen, bestehen aus ACE-Hemmern, Betablockern und Aldosteron-Antagonisten ²⁻⁵.

Die Therapie für die akut dekompensierten Herzinsuffizienz (ADHF) ohne Schock besteht aus Schleifendiuretika und Vasodilatoren zur Vor- und Nachlastsenkung. Bei Patienten mit Hypotonie, Hypoperfusion und Schock erfolgt die Anwendung von Vasopressoren wie z.B. Dobutamin ².

Zu den Vertretern der Vasodilatoren gehören die NO-Donatoren und Nitraten. Neue Molekülklassen mit ähnlichen Wirkungen sind die entwickelten NO-unabhängige, häm-abhängige sGC-Stimulatoren und NO-unabhängige, häm-unabhängige sGC-Aktivatoren ^{6,7}.

1.1 Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz wird definiert als das Unvermögen des Herzens, Organe und Gewebe mit Blut und Sauerstoff unter Belastung und/oder in Ruhe zu versorgen. Klinisch charakteristisch sind eine zunehmende Dyspnoe und eine eingeschränkte Belastbarkeit ^{2,8}. Abhängig von der Verlaufsdauer kann die Herzinsuffizienz in eine akute und chronische Form unterteilt werden. Morphologisch sind entweder der rechte, der linke oder beide Ventrikel davon betroffen. Die Erkrankung kann in Abhängigkeit der Leistungsfähigkeit des Patienten nach der New York Heart Association in 4 Kategorien (NYHA I-IV) oder entsprechend der American Heart Association nach Progredienz (St. A-C) der Erkrankung klassifiziert werden ⁹.

Die Prävalenz der Herzinsuffizienz steigt in den Industrieländern im Zusammenhang mit dem Älterwerden der Gesellschaft. Die Häufigkeit der chronischen Herzinsuffizienz beträgt in den USA beispielsweise über 5 Mio. und ist eine der häufigsten Ursachen für stationäre Einweisungen ¹⁰. Die Inzidenz und die Prävalenz steigt mit dem Alter an: zwischen 45 und 55 Jahre sind weniger als 1 % der Bevölkerung erkrankt, zwischen 65

und 75 Jahre bereits 2-5 % und bei über 80-jährigen 10 %. Männer sind dabei häufiger betroffen als Frauen. Die Hauptursachen der Herzinsuffizienz sind Folgen koronarer Herzerkrankungen und langjähriger arterieller Hypertonie. Weitere Ursachen sind unter anderem Herzvitien, Kardiomyopathien oder entzündliche Herzmuskelerkrankungen^{1,11}.

Pathophysiologisch kommt es initial zu einer Schädigung des Myokards durch Druck, Volumen oder Gewebeverlust, die zu einer anfänglichen Kontraktilitätsabnahme führt. In der Folge werden kompensatorisch neuroendokrine Mechanismen aktiviert, wie z.B. das sympathische Nervensystem und das Renin-Angiotensin-Aldosteron System (RAAS). Zusätzlich werden atriales natriuretisches Peptid (ANP) und brain natriuretisches Peptid (BNP) ausgeschüttet^{12,13}. Es kommt zur peripheren Vasokonstriktion mit Zunahme des peripheren Widerstandes sowie zur Natrium-Wasser-Retention in der Niere. Daraus resultiert eine Erhöhung der ventrikulären Vor- und Nachlast. Der Gewebeverlust führt zur Aktivierung unterschiedlicher sekundärer Mediatoren wie Angiotensin II, Endothelin und proinflammatorischen Cytokinen (z.B. TNF α , Interleukin 6). Diese Mediatoren aktivieren, in Verbindung mit oxidativen Stress, Nachfolgeeffektoren wie z.B. Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 und Matrixmetalloproteinasen^{14,15}. Diese Effektoren wirken zusammen mit Noradrenalin, des sympathischen Nervensystems, direkt toxisch auf die Kardiomyozyten oder indirekt über die Veränderung der hämodynamischen Bedingungen. Es kommt dadurch zur endothelialen und myokardialen Dysfunktion und zu einem kardialen und vaskulären Remodelling mit Hypertrophie, Fibrose, Dilatation und Nekrose¹⁴⁻²⁰.

Die Herzinsuffizienz ist unabhängig von der Genese, trotz medikamentöser und apparativer Therapiemaßnahmen, mit einer hohen Morbidität und Mortalität verbunden¹. Jedoch konnte aufgrund eines verbesserten Managements in Europa in den letzten 20 Jahren eine Reduktion der standardisierten Todesrate um 40% und ein späteres mittleres Sterbealter der Patienten erreicht werden²¹. Die Therapie der chronischen Herzinsuffizienz erfolgt pharmakologisch nach einem Stufenplan in Abhängigkeit vom NYHA-Stadium, der Ejektionsfraktion (EF) und den Ursachen. Primär erfolgt eine Behandlung mit ACE-Hemmern. Nach einem Myokardinfarkt oder bei arterieller Hypertonie und einer NYHA II-Klassifizierung werden zusätzlich Betablocker verabreicht. Ab NYHA III und IV oder nach einem Herzinfarkt wird additiv die Gabe von Aldosteron-Antagonisten empfohlen. Bei vorliegender Flüssigkeitsretention können

Diuretika zum Einsatz kommen ²⁻⁵. Als nicht-medikamentösen Therapien, zur Verbesserung der Morbidität und Mortalität, zählen zusätzlich die kardiale Resynchronisationstherapie (CRT) bei NYHA III-IV, bestehendem kompletten Linksschenkelblock (QRS>120ms) und einer EF \leq 35 %, oder die Einlage eines intrakardialen Defibrillators (ICD) bei EF \leq 35 % ²²⁻²⁶.

Bei einer ADHF ohne schwerwiegender Hypotension erfolgt zur Verminderung der Vor- und Nachlast primär die Gabe von Schleifendiuretika (Furosemid, Torasemid) und Vasodilatoren (Nitroglycerin (NG), Nitroprusside, Nesiritide etc.). Bei einem niedrigen systolischen Blutdruck und Anzeichen von Hypoperfusion erfolgt die Gabe von inotropen Substanzen, wie z.B. Dobutamin ².

1.2 Relaxation des Herzens

Eine gestörte Relaxation des Herzens kann bei vielen Formen der Herzinsuffizienz beobachtet werden ²⁷⁻³⁰. Die Relaxation des Herzens ist ein Prozess, durch den das Herz in den Zustand vor der Kontraktion zurückkehrt. Sie beginnt am Ende des Blutausswurfes des linken Ventrikels, geht weiter in die isovolumetrische Periode, die frühe Ventrikelfüllung, die Diastasis und der Vorhofkontraktion bis über zur Öffnung der atrioventrikulären Klappen ^{27,31}. In der isovolumetrischen Periode kommt es zur Abnahme des Druckes im Ventrikel bei konstantem Volumen. Es handelt sich um eine aktive Relaxation, die durch die ATP-abhängige Calcium-Regulation in den Kardiomyozyten bestimmt wird sowie durch die passiven mechanischen Kräfte, welche als elastische Energie während der Kontraktion gespeichert wurden und nun durch die Relaxation freigesetzt werden ^{28,30,32,33}. Bei der frühen Ventrikelfüllung werden 80% bis 85% der gesamten Ventrikelkapazität nach Öffnung der Mitralklappe erreicht. Es wird dabei der Druckgradient zwischen Vorhof und Kammer ausgenutzt, der durch die aktive Relaxation während der isovolumetrischen Phase und durch die passive diastolische Deformationseigenschaft des Ventrikels aufgebaut wird. Die Füllung wird somit von einem aktiven und passiven Mechanismus beeinflusst ^{28,33-35}. Die passive diastolische Deformationseigenschaft des Ventrikels wird bestimmt durch die viskoelastische Eigenschaft des Ventrikels, seine Steifigkeit sowie der Dehnbarkeit ^{28,32,36}. Dabei sind sowohl intra- wie auch extrazelluläre Strukturen beteiligt, u.a. die Interaktion zwischen dünnen und dicken Filamenten, die Calcium-Sensitivität der Myofilamente, die Eigenschaft des Titins, der Hypertrophiegrad der Herzmuskelzellen und die

Kollageneigenschaft der extrazellulären Matrix ³⁷⁻⁴². Die Relaxationsgeschwindigkeit ist eine bedeutende Determinante für die schnelle diastolische Füllung des Ventrikels ⁴³.

Die Relaxation des Herzens erfolgt auf zellulärer Ebene durch einen Abfall der intrazellulären Calciumkonzentration nach der Systole, wodurch das Calcium von Troponin C (TnC) dissoziiert und der Herzmuskel relaxieren kann. Dabei sind 3 Wege beteiligt: 1) die sarkoplasmatische Ca^{2+} -ATPase (SERCA), 2) der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) und 3) die membrangebundene Ca^{2+} -ATPase. Bis zu 70% des Calciums wird unter Energieverbrauch über die SERCA in das sarkoplasmatische Retikulum (SR) transportiert ⁴⁴⁻⁴⁶. An der Regulation der Calcium-Aufnahme ist Phospholamban (PLB) beteiligt, welches in der dephosphorylierten Form die SERCA hemmt. Durch Phosphorylierung des PLB wird der inhibitorische Effekt aufgehoben ^{47,48}. Ein weiterer Mechanismus zur Beschleunigung der Relaxation ist die Phosphorylierung des Myosin Bindungsprotein C und des Troponin I (TnI), welches die Bindungsseite zwischen Myosin und Aktin hemmt. Dadurch kommt es zu einer Abnahme der Calciumsensibilität des Myofilament und zu einem verstärkten Abdiffundieren von Calcium-Ionen von TnC. ⁴⁸⁻⁵³. Die Rate dieser zellulären Prozesse wird durch die Geschwindigkeit der aktiven ventrikulären Relaxation bestimmt ²⁸.

Bei der Herzinsuffizienz zeigt sich während der Diastole eine gestörte Aufnahme des Calciums aus dem Zytosol ins SR, über die SERCA-Pumpe oder den NCX s.o. Dies führt zu einer gestörten Relaxation, da der längere Verbleib des Calciums im Zytosol die Geschwindigkeit reduziert mit der das Calcium vom TnC abdiffundiert und sich die Myosin-Aktin Bindung löst ^{54,55}. Außerdem entsteht auf funktioneller Ebene eine Abnahme des Frank-Starling Mechanismus. Das Frank-Starling-Mechanismus bewirkt, dass ein höheres Schlagvolumen (SV) durch ein erhöhtes enddiastolisches Volumen (EDV), aufgrund der Verlängerung und somit Vordehnung der Muskelfaser, erreicht werden kann ^{56,57}. Bei der Herzinsuffizienz besteht eine Störung der aktiven Relaxation sowie der Dehnbarkeit des Ventrikels während der Diastole, z.B. durch eine Hypertrophie des linken Ventrikels ^{16-20,28,33-35}. Durch die gestörte Dehnbarkeit stellt sich ein erhöhter linksventrikulärer enddiastolischer Druck (EDP) ein. Dieser führt dazu, dass der Druckgradient zwischen Atrium und Ventrikel vermindert ist und folglich die Füllung des Ventrikels gestört ist und somit EDV wie auch SV sinken ⁵⁸⁻⁶⁰.

1.3 NO-sGC-cGMP System

1.3.1 NO

NO bindet intrazellulär an die Häm-Gruppe der löslichen Guanylatzyklase (sGC) und aktiviert diese. Die sGC katalysiert die Synthese von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP) ⁶¹. cGMP ist als *Second Messenger* bei der Regulation unterschiedlicher Signalwege beteiligt. cGMP kann neben der sGC auch durch die partielle Guanylatzyklase (pGC) synthetisiert werden ⁶². Der Effekt variiert aufgrund der unterschiedlichen Lokalisation der Enzyme in den Zellen ^{63,64}. Die Zielstrukturen von cGMP sind cGMP-abhängige Phosphodiesterasen, Proteinkinasen, z.B. die Proteinkinase G (PKG), sowie Kationenkanäle ^{62,65-67}. Zusätzlich vermutet man eine Wechselwirkung mit der cAMP-Kaskade, welche zu einer Reduktion der Wirkung von Katecholaminen führt ^{68,69}. Die Voraussetzung für die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase durch NO ist das reduzierte Fe²⁺ der Häm-Gruppe ^{70,71}. Unter oxidativem Stress, u.a. bei Artherosklerose, Diabetes Mellitus und arterieller Hypertonie, ist die NO-sGC-cGMP-Kaskade gestört. Dabei entstehen Superoxide, welche die prosthetische Gruppe der sGC direkt oxidieren oder abbauen ⁷²⁻⁷⁶. Dadurch ist die Bindung von endogenem und exogenem NO an sGC sowie die Enzymaktivierung gestört ⁷⁶. Zusätzlich entsteht durch die Wechselwirkung von NO mit Superoxid Peroxynitrit, ein starker reaktiver Oxidant, welcher neben zytotoxischen Wirkungen zusätzlich auch eine vermehrte Oxidation der Häm-Gruppe von sGC bewirkt ^{74,76-79}. Die Bioverfügbarkeit von NO ist somit unter oxidativen Konditionen reduziert.

Durch diesen Mechanismus verliert auch die Therapie mit Nitraten und NO-Donatoren an Wirksamkeit. Das für längere Zeit exogen zugeführte NO führt ebenfalls zur vermehrten Bildung von Peroxynitrit ^{72,80-82}. Weitere Mechanismen, die zur Toleranzentwicklung beitragen, sind die Störung des mitochondrialen Enzyms Aldehyd Dehydrogenase 2 (ALDH2) mit gestörter Biotransformation der exogen zugeführten Nitraten wie Glyceryltrinitrat (GTN) und Isosorbit-5-Mononitrat (IS-5-MN), die gestörte Vasodilatation in Arterien und Venen durch gestörte endogene NO-Bildung aus endothelialen NO-Synthasen (eNOS), die S-Nitrosylierung von sGC und die daraus resultierende Desensibilisierung von sGC und der Hochregulation von Phosphodiesterasen 1A mit erhöhtem Abbau von cGMP. Somit kommt es bei der

Therapie zur Förderung des oxidativen Stresses, der mitochondrialen Toxizität und der endothelialen Dysfunktion in den Zellen^{83–88}. Trotz der raschen Toleranzentwicklung bei der Gabe von Nitraten und NO-Donatoren werden diese seit Jahrzehnten bis zur heutigen Zeit zur Therapie kardiovaskulärer Symptome, wie z.B. Angina Pectoris Beschwerden, genutzt. Dabei gibt es keine Evidenz für die Reduktion der Mortalitätsrate durch diesen Therapieansatz^{89,90}.

1.3.2 Effekte von NO auf die Relaxation der Kardiomyozyten

Endogenes und exogenes NO haben einen direkten Effekt auf Kardiomyozyten⁹¹. Aus der Aminosäure L-Arginin wird unter Verbrauch von NADPH und O₂ endogen NO und L-Citrullin gebildet. Die oxidative Umsetzung des N-terminalen Guanidinstickstoffs mit Sauerstoff wird durch die Familie der NO-Synthasen (NOS) katalysiert. Man unterscheidet dabei drei Isoformen, die (1) konstitutive neuronale NOS (nNOS), die (2) eNOS und die (3) induzierbare NOS (iNOS). nNOS sind in autonomen Nerven und Ganglien sowie im SR der Herzmuskelzellen lokalisiert, eNOS sind hauptsächlich im Endothel von Gefäßen und in Caveolen der Kardiomyozyten aufzufinden. iNOS werden unter pathophysiologischen Konditionen bei der Aktivierung der Immunantwort in den Kardiomyozyten hochreguliert. Dazu zählen Zustände wie die Reperfusion nach Ischämien, Sepsis, Herzinsuffizienz und Alterung^{91–93}.

NO führt zu einem positiv lusitropen Effekt mit beschleunigter myokardialer Relaxation und einer Zunahme ventrikulärer diastolischer Dehnbarkeit. Dies hat eine Verstärkung des Frank-Starling Mechanismus zur Folge^{94,95}. *In-vitro* konnte unter Gabe von exogenem NO an isolierten Papillarmuskeln und Kardiomyozyten von Frettchen und Ratten eine beschleunigte Relaxation und Zunahme der Dehnbarkeit beobachtet werden^{96,97}. Isolierte Herzen von Ratten und Meerschweinchen zeigten ebenfalls diesen Effekt auf^{98–101}. An gesunden Erwachsenen konnte *in-vivo* nach intrakoronarer Nitroprussid-Infusion die gleiche Wirkung erreicht werden¹⁰². Die Abnahme der Druck-Volumen-Kurve führt unabhängig vom Koronarfluss schließlich zur Zunahme des Frank-Starling Mechanismus¹⁰¹. In erkrankten hypertrophen Herzen zeigte sich eine Abnahme des EDP ohne die systolische Pumpfunktion des Herzens zu beeinträchtigen¹⁰³.

Auf zellulärer Ebene wird vermutet, dass für die beschleunigte Relaxation mittels NO eine cGMP/PKG-abhängige Phosphorylierung des TnI mit nachfolgender Verminderung der Calcium-Affinität zum Myofilament verantwortlich ist^{96,104–106}.

cGMP führt zusätzlich über die Aktivierung von PKG zur Phosphorylierung der α_{1c} Untereinheit der L-Type Calcium Kanäle mit Hemmung des intrazellulären Calciumeinstroms, welches ebenfalls die Sensibilität für Calcium reduziert¹⁰⁷. Auch die Phosphorylierung von PLB mit Zunahme der Calcium-Wiederaufnahme in das SR über die SERCA führt zu einem positiv lusitropen Effekt^{108,109}. Diskutiert wird außerdem eine cGMP-unabhängige Aktivierung der SERCA^{109–111}. Diese kann über eine Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) durch Hemmung der Proteinphosphatase oder über eine S-Nitrosylierung des PLB durch NO erreicht werden^{109,110,112}. Ein weiterer vorteilhafter Effekt ist die verbesserte passive Dehnbarkeit während der Diastole durch die PKG-abhängige Phosphorylierung des Titins, einem Molekül der Kardiomyozyten¹¹³.

1.4 Stimulatoren (BAY 41-2272 und BAY 63-2521) und Aktivatoren (BAY 60-2770 und BAY 58-2667) der löslichen Guanylatzyklase

Um die Limitation der NO-Therapie, insbesondere die Toleranzentwicklung und die Nebenwirkungen (siehe Abschnitt 1.3.), zu umgehen, sind neue Therapieansätze notwendig. Ziel ist es die sGC, unabhängig von NO, direkt zu aktivieren. Im Jahr 1994 wurde ein Molekül mit dieser Eigenschaft entdeckt, YC-1, ein Indazol-Derivat¹¹⁴. Basierend auf dieser Entdeckung wurden neue Moleküle synthetisiert, u.a. die Pyrazolpyridin-Derivate, NO-unabhängige, häm-abhängige sGC Stimulatoren und die Aminodicarboxylsäure-Derivate, NO- und häm-unabhängige Aktivatoren^{6,7,115}.

1.4.1 BAY 41-2272 und BAY 63-2521 (Riociguat)

BAY 41-2272 wurde aus der Leitstruktur des YC-1 synthetisiert, dem ersten sGC-Stimulator, der identifiziert wurde. Beide Strukturen wirken bei Zugabe von NO-Donatoren synergistisch mit NO auf die sGC. Die Wirksamkeit beider Strukturen hängt vom Redox-Zustand der Häm-Gruppe des Zielmoleküls ab. Bei oxidiertem (Fe^{3+}) oder fehlender Häm-Gruppe, was bei oxidativem Stress vermehrt vorkommt, zeigen beide Strukturen eine verminderte Wirksamkeit. Im Vergleich zur Leitstruktur erreicht BAY 41-2272 *in-vitro* und *in-vivo* eine Verdopplung des Wirkungsgrades. Beide Substanzen zeigen einen dualen Effekt, d.h. sie können einerseits die Sensibilität von sGC für endogenes oder exogenes NO erhöhen, andererseits kommt es zu einer Steigerung der sGC-Aktivität in Abwesenheit von NO^{116–119}. In hohen Konzentrationen wurde bei

BAY 41-2272 ein inhibitorischer Effekt auf die Phosphodiesterase 5 festgestellt¹²⁰. Bei Konzentrationen im therapeutischen Bereich konnte eine solche Inhibition nicht beobachtet werden^{7,121}.

Im experimentellen Herzinsuffizienz-Modell an anästhesierten Hunden ist der Effekt von BAY 41-2272 vergleichbar zu dem von NO-Donatoren: 1. eine konzentrationsabhängige Abnahme der Vor- und Nachlast mit Reduktion des pulmonal kapillären Verschlussdruckes (Pulmonary Capillary Wedge Pressure, PCWP) und des mittleren arteriellen Druckes (Medial Atrial Pressure, MAP), 2. eine Steigerung des Herzzeitvolumens (HZV) und des renalen Blutflusses ohne Veränderung der Glomerulären Flussrate (GFR) und 3. die Aktivierung des RAAS. Im Vergleich zu NG wurde durch Zugabe von BAY 41-2272 keine Verminderung des rechtsatrialen Druckes (RAP) beobachtet. Dies ist vermutlich ein Hinweis für den bevorzugten vasodilatierenden Effekt im arteriellen Gefäßsystem. Ein Grund dafür ist womöglich eine verminderte Bioverfügbarkeit an NO und niedriger Zahl an endothelialen NO-Synthasen im venösen System, um den synergistischen Effekt mit NO zu erhalten^{122,123}. Weitere vasodilatierende Wirkungen konnten in isolierten Gefäßen der Aorta, der Mesenterialarterie, der Pulmonalarterie, der Herzkranzgefäße und Venen nachgewiesen werden^{117,118,124–128}. Im isolierten Langendorff-Herz wurde durch Zugabe von BAY 41-2272 eine Verminderung des Koronarflussdruckes ohne Veränderung des linksventrikulären Druckes und der Herzfrequenz (HF) nachgewiesen¹²⁸. In einem *in-vivo* Modell mit hypertensiven Ratten wurde bei 8-wöchiger Therapiedauer eine dosisabhängige und langanhaltende Abnahme des Blutdruckes ohne Toleranzentwicklung sowie eine Abnahme der Mortalität beobachtet^{116,129}. Als negativer Aspekt wird ein theoretisch mögliches „Steal-Phänomen“ vermutet. Durch die bessere Wirkung des Stimulators bei hohen endogenen NO-Konzentrationen in gesunden Gefäßen kommt es zur Vasodilatation auf Kosten ischämischer Bezirke. Das Blut fließt von ischämischen Gefäßen in gesunde ab, wodurch es zu einer verstärkten Minderdurchblutung der bereits ischämischen Gebiete kommt. Dieses Phänomen konnte mit BAY 41-2272 jedoch noch nicht experimentell nachgewiesen werden¹²².

Neben dem vasodilatierendem Effekt von BAY 41-2272 konnte bei Ratten, die 8 Wochen mit N^o-nitro-L-arginine methyl-ester (L-NAME) und Riociguat therapiert wurden, auch eine präventive Wirkung auf die Entstehung von Myokardhypertrophien und myokardialer Fibrosierung beobachtet werden. L-NAME ist ein Inhibitor der NO-

Synthesen, durch den es bei langfristiger Gabe zu einer Erhöhung des Blutdruckes mit begleitenden morphologischen Veränderungen des Herzens kommt. Durch die gleichzeitige Applikation von BAY 41-2272 konnte die Wirkung von L-NAME abgeschwächt werden ^{127,129,130}. Des Weiteren konnte *in-vitro* und *in-vivo* eine Hemmung der Thrombozytenaggregation sowie eine Reduktion des vaskulären Remodellings, z.B. in einem induzierten Hypoxie-Modell neonataler Ratten, aufgezeigt werden ^{116,127,131,132}.

Riociguat (BAY 63-2521) ist ein optimierter sGC-Stimulator mit verbesserten Wirkungseigenschaften als BAY 41-2272 ⁷. Es wirkt gleichermaßen synergistisch mit endogenem als auch exogen zugeführtem NO, z.B. durch Zugabe des NO-Donator Diethylamine-NONOate (DEA/NO). Die Stimulation der sGC kann ebenfalls durch Zugabe von 1H-oxadiazolo quinoxalin-1-one (ODQ) blockiert werden, welches die prosthetische Häm-Gruppe der sGC oxidiert. *In-vitro* konnte ohne Zugabe von exogenem NO für BAY 63-2521 eine Steigerung der sGC-Aktivität um das 73-fache zum Baseline-Wert gemessen werden. Das ist fast viermal so hoch, wie für BAY 41-2272 (20-fach) detektiert wurde ^{7,133}.

Präklinisch konnte in zwei unabhängigen *in-vivo* Studien, zum einen durchgeführt mit chronisch hypoxischen Mäusen und Ratten mit Monocrotalin (MCT)-induzierter Pulmonal Arterieller Hypertonie (PAH), ein Rückgang der pulmonalen Hypertonie, der rechtsventrikulären Hypertrophie und des Remodelling von Pulmonalgefäßen beobachtet werden ¹³³. Zum anderen konnte in einer Studie nach 14-wöchiger Therapie unter Riociguat mit salzsensitiven Dahl-Ratten, ein gängiges Modell zur Untersuchungen der Hypertonie, der kardialen und renalen Hypertrophie/Fibrose, eine signifikante Retention der Hypertrophie und Fibrose, sowie eine Verbesserung der renalen und systolischen Funktion im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden. Gleichzeitig führte BAY 63-2521 zu einer Verminderung der Mortalität ¹³⁴.

In einer *proof-of-concept* Studie wurde Riociguat bei oraler Gabe sowohl von 45 gesunden Freiwilligen wie auch von 19 Patienten mit PAH gut vertragen ^{135,136}. In einer Phase II Studie konnte bei Langzeittherapien über 12 Wochen bei 72 Patienten mit Chronisch Thromboembolischer Pulmonaler Hypertonie (CTEPH) oder PAH eine gute Verträglichkeit sowie eine Verbesserung der Symptome und Verlängerung der 6 Minuten Gehstrecke beobachtet werden. In der *proof-of-concept* Studie konnte eine

verbesserte Wirksamkeit im Vergleich zu inhalativen NO, in Bezug auf eine Verminderung des systemischen (SVR), des pulmonalen (PVR) Gefäßwiderstandes sowie eine Erhöhung des HZV, gezeigt werden^{136,137}. Diese Effekte konnten in der CHEST-1 Studie, als multizentrische, randomisierte, plazebokontrollierten Phase III Studie und der PATENT-1 Studie, einer randomisierten, doppelblinden Phase III Studie bestätigt werden. In rund 700 Patienten mit CTEPH und PAH konnte eine Abnahme des Gefäßwiderstandes und des Pro-BNPs sowie Verbesserung der 6 Minuten Gehstrecke um 46 Meter bzw. 36 Meter gegenüber dem Plazebo demonstriert werden^{138,139}. Darauf basierend läuft aktuell eine Folgestudie zur Langzeittherapie bei PAH mit Riociguat (NCT 00863681).

Bereits seit April 2014 ist Riociguat (Handelsname: Adempas®) zur Anwendung bei inoperabler CTEPH und PAH von der European Medicine Agency in der Europäischen Union zugelassen¹⁴⁰.

Bei der oralen Gabe des Riociguat-Metaboliten BAY 60-4552 bei Herzinsuffizienz in einer *Single-dose* Studie wurde die Abnahme der Vor- und Nachlast mit Zunahme des HZV demonstriert¹⁴¹. In einer randomisierten, doppelblinden, plazebokontrollierten *Single-Dose* Studie bei diastolischer Herzinsuffizienz (DILATE-1) (n=39) und einer randomisierten, doppelblinden, plazebokontrollierten Phase IIb Studie bei linksventrikulärer systolischer Dysfunktion (n=201) und damit verbundenem erhöhten Pulmonalen Druck konnte zwar der primäre Endpunkt, d.h. die Abnahme des mittleren pulmonal arteriellen Druck (pMAP), nicht gezeigt werden, jedoch eine Zunahme des SV und HZV nachgewiesen werden^{142,143}.

Aktuell wird zudem eine multizentrische randomisierte, plazebokontrollierte Phase II Studie zur Kontrolle der Wirksamkeit bei Patienten mit PAH und chronischer Herzinsuffizienz mit Riociguat (NCT00454558) durchgeführt.

1.4.2 BAY 60-2770 und BAY 58-2667 (Cinaciguat)

BAY 60-2770 und Cinaciguat (BAY 58-2667) sind NO-und häm-unabhängige Aktivatoren der sGC. Sie agieren im Vergleich zu den Stimulatoren additiv mit NO bei Zugabe von NO-Donatoren. Die Wirksamkeit von Cinaciguat auf die Aktivierung von sGC verstärkt sich bei oxidiertem oder fehlender Häm-Gruppe. Dies ist ein Zustand, der in Geweben mit oxidativem Stress vermehrt vorzufinden ist ^{6,144,145}. Die Aktivität der sGC bei Zugabe von Cinaciguat mit NO-Donatoren wurde *in-vitro* auf das 200fache im Bezug zur Baseline registriert ¹⁴⁴. Aufgrund der guten Wirksamkeit dieser Wirkstoffe bei oxidativem Stress, der u.a. bei Artherosklerose, arterieller Hypertonie, Diabetes Mellitus und Herzinsuffizienz vorhanden ist, könnte die Gabe dieser Substanz einen möglichen Therapieansatz bei kardiovaskulären Erkrankungen darstellen ⁷⁶. Ein weiterer Vorteil gegenüber BAY 41-2772 und Riociguat besteht in der Umkehr des „Steal Phänomens“, wie im Abschnitt 1.4.1 beschrieben. Die Gefäße in Bereichen mit oxidativem Stress werden erweitert, wodurch es zu einer Verbesserung der Durchblutung erkrankter Gefäße kommt ^{6,122}.

In präklinischen *in-vivo* Studien an hypertensiven Ratten konnte eine dosisabhängige und langanhaltende antihypertensive Wirkung nachgewiesen werden. Gleichzeitig kam es zu einer Erhöhung der HF ¹⁴⁴. Die hämodynamischen Eigenschaften von GTN und Cinaciguat wurden an anästhesierten Hunden verglichen. Beide zeigten ähnliche Effekte in Bezug auf die Abnahme des Blutdruckes und des diastolischen pulmonalarteriellen Druckes. Anders als unter BAY 41-2772 wurde eine Abnahme des RAP beobachtet ¹⁴⁴. Somit konnte gezeigt werden, dass Cinaciguat sowohl im venösen wie auch im arteriellen System gut wirksam ist. Dies konnte, wie bereits unter der Gabe von BAY 41-2772, in einem experimentellen Herzinsuffizienz-Modell mit Cinaciguat, eine konzentrationsabhängige Abnahme der Vor- und Nachlast aufgrund systemischer und renaler Vasodilatation mit Abnahme des Blutdruckes, des Druckes der Pulmonalarterien und des PCWP und Zunahme des SV, nachgewiesen werden ¹²³. Anders als unter BAY 41-2772 konnte auch in diesem Modell eine Reduktion des RAP beobachtet werden. Des Weiteren zeigten sich keine Veränderungen der GFR der Niere und keine Aktivierung des RAAS. ANP und BNP, Marker für die Vor- und Nachlast, waren unter dem Einfluss von Cinaciguat vermindert ¹⁴⁶. Des Weiteren wirkt Cinaciguat *in-vitro* und *in-vivo* vasorelaxierend auf NO-resistente Gefäße ^{6,144,147}.

Klinisch wurde Cinaciguat sowohl bei gesunden Männern in einer Phase I Studie wie auch bei Patienten mit ADHF in einer Phase II Studie gut toleriert. Die Phase I Studie diente dabei zur Dosisfindung bei 76 freiwilligen gesunden Männern nach einem randomisierten, einfach-verblindeten, plazebokontrollierten und dosiseskalierenden Protokoll. Es zeigte sich bei einer intravenösen Gabe von 200µg/h für 4 Stunden eine gute Verträglichkeit mit nur milden Nebenwirkungen, wie Kopfschmerzen oder Nasenbluten und keine EKG-Veränderungen. Es konnten keine relevanten pathologisch hämatologischen oder klinisch-chemischen Effekte beobachtet werden ¹⁴⁸. In einer multizentrischen, nicht-randomisierten, nicht-verblindeten, unkontrollierten Phase II Studie wurden bei Patienten mit ADHF (NYHA III/IV und PCWP >18mmHg) nach 2- und 6-stündiger intravenöser Gabe von Cinaciguat hämodynamische Veränderungen beobachtet. Dafür dienten nicht-invasive Messungen, wie die Messung des systolischen, diastolischen und mittleren Blutdrucks, sowie die invasive Messung mittels Swan- Ganz Katheter des PCWP, RAP, mPAP, PVR, SVR und HZV. 90% der Patienten reagierten nach intravenöser Gabe mit Abnahme des PCWP um mindestens 4 mmHg. Die subjektive Tolerabilität wurde durch Befragung des Patienten bezüglich des Wohlbefindens, des NYHA Stadiums, des Dyspnoe-Scores und der Nebenwirkungen vor, kurz nach und 18 Stunden nach Gabe der Infusion erfasst. Es zeigte sich beim größten Teil der Probanden eine subjektive Verbesserung der Luftnot. Jedoch muss dieses Ergebnis als spekulativ betrachtet werden, da eine Kontrollgruppe fehlte ¹⁴⁹. Wie bereits im präklinischen Versuch festgestellt, konnte in beiden Studien eine Abnahme der Vor- und Nachlast mit Reduktion des PCWP, RAP, SVR und PVR mit Zunahme des HZV und leichter Zunahme der HF gezeigt werden ^{148,149}. In einer multizentrischen, internationalen, randomisierten, plazebokontrollierten Phase IIb Studie zur Erfassung der Sicherheit und Effektivität der Therapie bei ADHF kam es, trotz reduzierter Startdosis von Cinaciguat mit jedoch verlängerter Wirkstoffgabe im Vergleich zur präklinischen Studie, zu symptomatischen hypotensiven Blutdruckwerten (<90mmHg). Aufgründessen musste die Studie vorzeitig abgebrochen werden ^{150,151}.

Weitere relevante Effekte unter Cinaciguat, welche bei kardiovaskulären Erkrankungen eine Rolle spielen, wie die Hemmung der Thrombozytenaggregation *in-vitro* und *in-vivo*, konnte bereits für Riociguat gezeigt werden ^{6,144,152}. In zwei Modellen des induzierten Myokardinfarktes führte die Gabe von Cinaciguat sowohl zur Reduktion des Infarktareals als auch zu einer Verbesserung der systolischen und diastolischen

Funktion im Infarktareal ^{147,153}. Hinweise auf eine mögliche Wirksamkeit von Cinaciguat bei PAH erlauben die Ergebnisse einer Maus-Studie mit induzierter PAH. Hier zeigte sich eine Abnahme der pulmonalen Hypertonie, der rechtsventrikulären Hypertrophie und des pulmonal vaskulären Remodellings ¹⁵⁴.

1.5 Fragestellung

Wie bereits beschrieben, haben Nitrate und NO-Donatoren einen vorteilhaften Effekt auf die Relaxationsgeschwindigkeit und der diastolischen Dehnbarkeit von Kardiomyozyten mit Zunahme des Frank-Starling Mechanismus⁹⁴. NO ruft somit einen akuten und chronischen lusitropen Effekt in Kardiomyozyten hervor. Der akute lusitrope Effekt wirkt sich dabei auf die myokardiale Relaxation und diastolische Dehnbarkeit aus. Der chronische Effekt beeinflusst primär die diastolische Dehnbarkeit des Herzens^{93,95,100,102,155}.

Die chronische Applikation von Nitraten und NO-Donatoren weist jedoch, wie bereits beschrieben, wesentliche Nachteile auf. Innerhalb kurzer Zeit kann sich eine Resistenz der Zielmoleküle und zur Bildung von Peroxynitrit kommen^{72-79,79,87}. Um die negativen Einflüsse von NO zu umgehen, wurden zwei Molekülgruppen entwickelt, die unabhängig von NO wirksam sind, die sGC-Stimulatoren und die sGC-Aktivatoren^{6,7}. Sowohl sGC-Stimulatoren als auch sGC-Aktivatoren wurden bereits in verschiedenen klinischen Studien sowie in Tiermodellen untersucht. Bisher gibt es jedoch keine Daten darüber, ob und welche Effekte Vertreter der beiden Substanzgruppen, unabhängig von äußeren Faktoren, wie der Einfluss der Koronardurchblutung und neuroendokrinen Substanzen, auf die Kontraktilität und Relaxation von isolierten Kardiomyozyten ausüben^{156,157}.

In der vorliegenden *in-vitro* Arbeit soll die Charakterisierung der inotropen und lusitropen Effekte von Riociguat und Cinaciguat sowie ihrer Vorläufersubstanzen BAY 41-2272 und BAY 60-2770 an isolierten Rattenkardiomyozyten erfolgen¹⁵⁶. Darüber hinaus soll ein Vergleich mit den ebenfalls in dieser Arbeit erhobenen Daten zu inotropen und lusitropen Effekten der NO-Donatoren DEA/NO und SIN-1 Chlorid erfasst werden. Zur Validierung der Messmethode wurden Isoproterenol und Verapamil eingesetzt. Isoproterenol ist ein Agonist des β -Adrenorezeptors, Verapamil hingegen ein Calcium-Antagonist. Die sGC katalysiert im aktivierten Zustand die Umsetzung von GTP zu cGMP. Um festzustellen, ob es unter Zugabe der Prüfsubstanzen (Cinaciguat, Riociguat, Isoproterenol und DEA/NO) zu einer Aktivierung/Stimulation der sGC kommt, wird nach der Behandlung mit den entsprechenden Substanzen der cGMP-Gehalt in den isolierten Kardiomyozyten bestimmt. Als Referenz wird die Bestimmung von cAMP herangezogen. Isoproterenol induziert über die Aktivierung der

Adenylatzyklase (AC) verstärkt die Bildung von cAMP, während für Cinaciguat, Riociguat und DEA/NO, die alle eine Aktivierung der sGC induzieren, kein Einfluss zu erwarten ist.

2 Material und Methoden

2.1 Zellisolation

2.1.1 Organentnahme

Zur Anästhesie wurden Ratten (180-200g, 6-8 Wochen alt) des Stammes Wistar Han (CrI: WI(Han) Charles River Laboratories, Sulzfeld, D) intraperitoneal 375µg/kg Thiopental (Altana, Konstanz, D) zusammen mit 2500IU Heparin injiziert. Nach Erlöschen des Schmerzreizes und des Cornealreflexes, die zur Bestimmung der Betäubungstiefe dienen, wurde die Präparation begonnen. Das Fell wurde zuerst mit Ethanol (Merck, Darmstadt, D) desinfiziert. Unterhalb der Zwerchfellebene wurde ein transversaler Schnitt gesetzt. Der Thorax wurde anschließend durch ein entlang des Sternums vertikal verlaufenden Schnitt geöffnet. Um das Herz zu entnehmen, wurden die Gefäße proximal des Herzens abgesetzt. Der am Perikard fixierte Thymus wurde entnommen, um den darunterliegenden Aortenbogen nicht zu perforieren. Anschließend wurde das Präparat zügig in eisgekühlter 0,9%iger NaCl-Lösung (Merck, Darmstadt, D) bei 4C° gespült. Durch die niedrige Temperatur wurden Stoffwechselfunktionen und der Sauerstoffverbrauch des Herzens reduziert, um den ischämischen Schaden bei fehlender Perfusion zu minimieren. Unter freier Sicht wurde anschließend das Herz von Resten der Lunge, des Thymus und des Ösophagus befreit und anschließend die Aorta freipräpariert^{157,158}.

2.1.2 Prinzip der Langendorff-Anlage

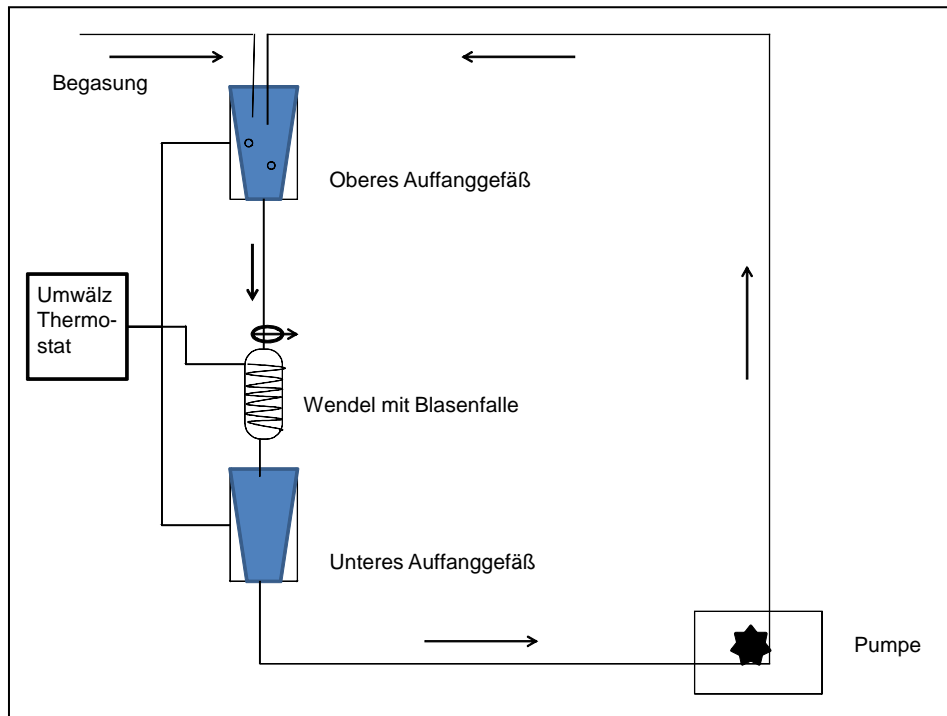


Abb. 2.1.1: Langendorff Anlage (schematisch): Retrograde Perfusion des Herzes über die Aorta des Herzpräparates mit einer oxygenierten Henseleit-Lösung. Der Abstand der übereinanderliegenden 2 Gefäße bestimmt den Perfusionsdruck (65mmHg) in den Rattenherzen. Um einen geschlossenen Kreislauf zu erhalten dient eine Peristaltikpumpe, welche die Lösung vom unteren zum oberen Gefäß befördert. Der Umwälzthermostat führt zum Wärmeausgleich, die Blasenfalle schützt vor Luftembolien ^{159,160}.

Die Langendorff-Anlage (Abb. 2.1.1) besteht aus zwei doppelwandigen Gefäßen (Quarzglas: Medizinisch-technische Werke, Berlin, D) die über ein Umwälzthermostat (Julabo, Seelbach, D) auf 37°C temperiert werden. Die Gefäße sind übereinander angeordnet und bilden dadurch ein oberes und ein unteres Reservoir. Der Abstand der zwei Gefäße beträgt ungefähr 90cm, wobei die Höhe der Wassersäule den Perfusionsdruck bestimmt. Bei Rattenherzen wird der Zieldruck von 65mmHg angestrebt. In der Verbindung der beiden Gefäße ist eine Wendelsäule mit integrierter Blasenfalle (Quarzglas, Medizinisch-technische Werke, Berlin, D) zwischengeschaltet, die das Herz vor Luftembolien schützt. Die doppelwandig ausgeführte Wendelsäule ist ebenfalls an das Umwälzthermostat angeschlossen und dient dem Ausgleich von Wärmeverlusten. Der untere Ausgang der Wendelsäule ist mit einer modifizierten Kanüle, dem sogenannte Konus, verbunden, über die das Herz angehängt wird. Um eine Zirkulation zu ermöglichen ist der Ausgang des unteren Gefäßes über einen Schlauch

mit dem oberen Reservoir verbunden. Die aufgefangene Flüssigkeit wird dabei über eine Peristaltikpumpe (Ismatec, Wertheim-Mondfeld, D) in das obere Gefäß gepumpt. Das obere Reservoir wird zudem über einen weiteren Zugang mit Carbogen (95% O₂/5% CO₂) begast. Um den Wärme- und Flüssigkeitsverlust zu minimieren, werden beide Gefäße mit einem Kunststoffdeckel abgedeckt.

2.1.3 Anschluss des Herzens an die Langendorff-Anlage

Zur Vorbereitung wurde die Langendorff-Anlage zunächst mit 2 Liter Aqua dest. und anschließend mit Isolationspuffer durchgespült. In das obere Reservoir wurden 75-80ml frischer Isolationspuffer (modifizierter Krebs-Henseleit Puffer: 110mM NaCl, 2,6mM KCL, 1,2mM MgSO₄, 1,2mM KH₂PO₄, 2 mM HEPES, 11mM Glucose, pH: 7,4) gegeben, auf 37°C temperiert und für etwa 30min mit Carbogen begast. Anschließend wurde der pH-Wert des Puffers kontrolliert und ggf. durch Zugabe von 1M NaOH korrigiert. Das freipräparierte Rattenherz wurde am Aortenbogen unterhalb des Truncus brachiocephalicus abgesetzt, über die Aorta am Konus unterhalb der Wendel mit der Langendorff-Anlage verbunden und mit einem Faden fixiert. Dabei musste beachtet werden, dass die Aortenabgänge verschlossen und die Koronargefäße freigehalten wurden. Eine Penetration der Herzklappen sollte ebenfalls vermieden werden (siehe Abb. 2.1.2). Um restliche Blutbestandteile des Herzens zu entfernen, wurde das Herz für 2-3min mit dem temperierten Isolationspuffer durchgespült. Das Perfusat wurde anschließend verworfen.



Abb. 2.1.2: Langendorff-Herz retrograd fixiert über die Aorta an der Langendorff-Anlage unter Freihaltung der Koronargefäße und Verschluß der Aortenabgänge

2.1.4 Perfusion des Herzens

Für die Isolation wurden 360mg/l (333U/mg) Collagenase Typ II (Worthington, Lakewood, USA), 33 μ M CaCl₂ (Calciumchlorid, Merck, Darmstadt, D) und BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich, Seelze, D) in 10-20ml des temperierten Isolationspuffer gelöst und in das obere Reservoir gegeben. Die Collagenase diente dazu, die Kardiomyozyten aus dem Zellverband enzymatisch zu isolieren. Das BSA wirkte als Radikalfänger und das CaCl₂ wurde als Cofaktor zur Aktivierung der Collagenase benötigt. Das Perfusat wurde im unteren Reservoir aufgefangen und in der Langendorff-Anlage zirkuliert. Das Herz wurde für 25-30 Minuten bei einem konstanten Druck von 65mmHg, einer Temperatur von 37°C und fortwährender Begasung mit Carbogen perfundiert. Die Tropfgeschwindigkeit wurde dabei auf etwa 1Tropfen/s eingestellt.

2.1.5 Isolation und Anfärben

Das Herz wurde anschließend von der Anlage abgenommen, in eine Petrischale mit 10ml Collagenaselösung gegeben und die Vorhöfe an der Ventilebene und der Aorta entfernt. Das nun freiliegende Herzventrikelgewebe wurde mit zwei Skalpellern manuell in ca. 1mm³ Stücke zerkleinert und anschließend in ca. 40ml der Perfusionslösung im unteren Reservoir der Langendorff-Anlage für 10min dispensiert. Die Lösung wurde dabei weiter mit Carbogen begast, das über den unteren Ausgang des Gefäßes zugeführt wurde. Die nun erhaltene Zellsuspension wurde durch einen Nylonfilter (Neolab, Heidelberg, D) mit einer Porengröße von 200 μ M in ein 50ml Schraubdeckelröhrchen (BD Falcon, D) abfiltriert, um das verbleibende Bindegewebe und die unverdauten Gewebereste zu entfernen.

Die erhaltene Zellsuspension wurde für 2min bei 43g zentrifugiert (Zentrifugen Rotina 43R, Mikro 200R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, D), um die Kardiomyozyten von anderen Zellen und geschädigten Kardiomyozyten zu trennen. Die Herzmuskelzellen sammeln sich dabei aufgrund der höheren Dichte am Boden des Zentrifugenröhrchens, deshalb konnte der Überstand problemlos verworfen werden. Die verbliebenen Zellen wurden in frischem Isolationspuffer mit einer CaCl₂ Konzentration von 200 μ M resuspendiert, um den Calciumgehalt schrittweise an die benötigten Untersuchungsbedingungen anzugleichen. Der Waschschrift wurde wiederholt, wobei die Zellen diesmal in Isolationspuffer mit 500 μ M CaCl₂ aufgenommen wurden. Nach

einer abschließenden Zentrifugation wurden die Kardiomyozyten in Versuchspuffer (117mM NaCl, 2,8mM KCl, 0,6mM MgCl₂, 1,2mM KH₂PO₄, 10mM HEPES, 1,2mM CaCl₂, pH: 7,3 bei 20°C) überführt.

Zur Kontrolle der Isolation wurden anschließend einige µl Suspensionen in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer (Brand, Wertheim, D) bei 10-40facher Vergrößerung betrachtet. Dabei wurde die Anzahl der intakten Zellen gezählt. Die vitalen Herzmuskelzellen sind durch eine längliche, quadratische Form mit klar abgrenzbarem Zellrand und Querstreifung charakterisiert. Während sich abgestorbene Zellen durch eine runde, geschrumpfte Form ohne abgrenzbaren Rändern und nicht erkennbarer Querstreifung auszeichnen. Das Ergebnis einer Isolation waren im Durchschnitt 2-3 x 10⁶ Zellen, wobei 70-80 % davon intakt waren.

Die isolierten Zellen wurden auf eine Dichte von 5 x 10⁵ Zellen/ml verdünnt. Je 2ml der Suspension wurde in jede Kammer eines 4-Kammer-Deckgläschen (Nunc, Roskilde, DK) gegeben, die jeweils zuvor mit 10µg/ml Laminin (Sigma-Aldrich, Seelze, D) beschichtet wurden. Zum Adhären werden die Kardiomyozyten für mindestens 1h bei Raumtemperatur gelagert. Danach wurde der Puffer entfernt und die Zellen mit je 0,5ml pro Kammer gewaschen und anschließend für 10 Minuten mit 2µg/ml Versuchspuffer Ca²⁺-sensitiven Farbstoff Fura-2-AM (Sigma-Aldrich, Seelze, D) bei Raumtemperatur unter sanftem Schwenken (Schwenktisch Duomax 1030, Heidolph, Schwabach, D) inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen zweimal mit frischem Versuchspuffer gewaschen um den restlichen Farbstoff zu entfernen.

2.2 Messung der Kontraktion und der Ca²⁺-Ratio

Für die Messung wurde in die 4-Kammer-Deckgläser mit den Kardiomyozyten je 450µl Versuchspuffer pro Kammer vorgelegt. Die Messung der zellulären Kontraktion und intrazellulären Calcium-Transienten erfolgte mittels eines inversen Fluoreszenzmikroskops (Leica DM IRB, Wetzlar, D) mit angeschlossenem Kontraktions- und Calcium-Detektionssystem (IonOptix, Milton, USA). Dazu wurde in die Kammer eine Elektrode (Medizintechnik, Universitätsmedizin Greifswald, D) eingebracht, die über einen Stimulator (Myopacer, IonOptix, Milton, USA) gesteuert, die Zellen mit einer Stärke von 20V bei einer Frequenz von 1Hz und einer Stimulationsdauer von 0,5s während der Messung permanent stimulierte. Mit einer Kamera (Myocam, IonOptix, Milton, USA) und dem Detektionssystem (Interface,

IonOptix, Milton, USA) wurde die Kontraktion aufgezeichnet und mit Hilfe der zugehörigen Software (IonWizard, IonOptix, Milton, USA) ausgewertet. Für die Auswertung wurden folgende Parameter genutzt, die mit der IonOptix Software berechnet wurden: die relative Zellverkürzung bezogen auf die maximale Zelllänge (bl peak h%), die Kontraktionsgeschwindigkeit (Departure velocity, dep v) sowie die Relaxationsgeschwindigkeit (Return velocity, ret v).

Simultan zur Kontraktion wurde die Fluoreszenz des Ca^{2+} -sensitiven Farbstoffes Fur-2 in den Kardiomyozyten durch das Detektionssystem mit Hilfe des Fluorescence Interface (IonOptix, Milton, USA) bei 340 und 380nm Wellenlänge verfolgt. Die Ca^{2+} -Ratio, der Quotient dieser beiden Wellenlängen, ist ein Maß für den intrazellulären Calcium-Gehalt. Entsprechend zur Kontraktion wurden mit Hilfe der Software verschiedene Kennwerte berechnet, von denen der relative Ca^{2+} -Transient bezogen auf das maximale Fluoreszenzsignal (bl % peak) in die Auswertung eingingen.



Abb. 2.2.1 Anlage bestehend aus einem inversen Fluoreszenzmikroskop mit angeschlossenem Kontraktions- und Calciumdetektionssystem. Simultane Messung der Fluoreszenz des Ca^{2+} -sensitiven Farbstoffes Fur-2 in den Kardiomyozyten mit dem Detektionssystem mit Hilfe des Fluorescence Interface (IonOptix, Milton, USA) bei 340 und 380nm Wellenlänge

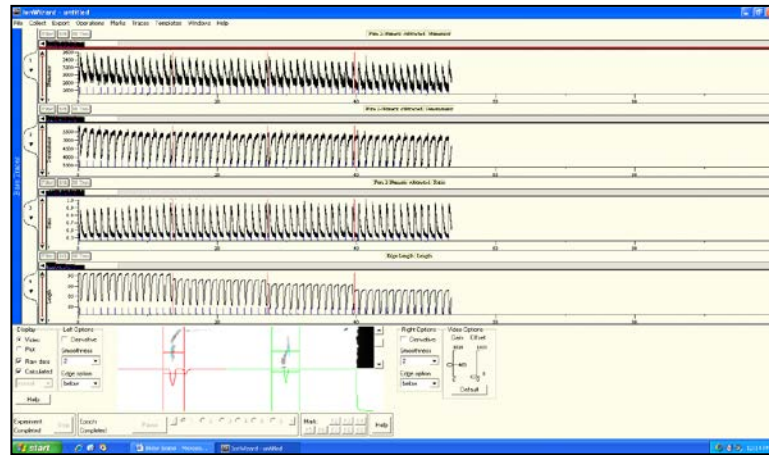


Abb. 2.2.2: Darstellung der Messung des Calcium-Transient/Kontraktilität bei adulten Kardiomyozyten am Bildschirm dargestellt

2.3 Aufbereitung der Stimulatoren und Aktivatoren der löslichen Guanylatzyklase und der Kontrollsubstanzen

Die Messungen wurden mit 8 unterschiedlichen Prüfsubstanzen, die aus 5 Substanzklassen bestehen, durchgeführt. Zuerst erfolgte die Aufbereitung der Substanzen in einer Verdünnungsreihe. Als Lösungsmittel fungierte hierbei vornehmlich Dimethylsulfoxid (DMSO), da einige Substanzen wasserunlöslich waren. Die weitere Verdünnung erfolgte dann mit dem Versuchspuffer. Um die Vergleichbarkeit der Effekte der einzelnen Substanzen zu gewährleisten wurden alle Konzentrationen der eingesetzten Stoffe mit der identischen, minimal möglichen Menge des Lösungsmittels versetzt. Als Kontrolle diente VP mit vergleichbaren Mengen DMSO. Die verwendeten Substanzklassen sind in einer Übersicht in Tabelle 2.3.1 dargestellt.

Substanz	Klasse	Hersteller	Konzentrationen
Isoproterenol	β -Adrenerger-Agonist	Sigma-Aldrich, Seelze, D	10^{-9} - 10^{-5} M (A)
Verapamil	Ca^{2+} -Antagonist	Sigma-Aldrich, Seelze, D	10^{-9} - 10^{-5} M (A)
Diethylamin-NONOate (DEA/NO)	NO-Donator	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	10^{-9} - 10^{-6} M (A)
3-Morpholinosydnonimine (SIN-1)	NO-Donator	Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA	10^{-9} - 10^{-6} M (C)
BAY 41-2272	sGC-Stimulator	Bayer Schering Pharma, Wuppertal, D	10^{-11} - 10^{-5} M (A)
Riociguat	sGC-Stimulator	Bayer Schering Pharma, Wuppertal, D	10^{-10} - 10^{-5} M (B)
BAY 60-2770	sGC-Aktivator	Bayer Schering Pharma, Wuppertal, D	10^{-12} - 10^{-6} M (A)
Cinaciguat	sGC-Aktivator	Bayer Schering Pharma, Wuppertal, D	10^{-10} - 10^{-5} M (B)

Tab: 2.3.1: Liste der in der Studie untersuchten Substanzen, Substanzklasse, Hersteller und Konzentrationen: Die Inkubationslösungen für die Kontraktilitätsmessungen enthielten 0,02% DMSO (A), 0,01% DMSO (B) oder kein DMSO (C)

2.4 Kontraktilitätsmessung unter Zugabe der Stimulatoren, Aktivatoren und Kontrollsubstanzen

Für die Messung der inotropen und lusitropen Effekte der untersuchten Substanzen wurde zunächst die basale Kontraktion und Ca^{2+} -Ratio der Zelle bestimmt. Die Zellen wurden dafür zunächst für mindestens 2 Minuten durch die elektrische Stimulation äquilibriert. Anschließend wurde unmittelbar (=Akutwert), sowie 2 und 5 Minuten nach Zugabe von jeweils 50 μl der vorbereiteten Grundkonzentrationen (siehe Abschnitt 2.3) zu den 450 μl Versuchspuffer in der Kammer erneut die Kontraktion und Ca^{2+} -Ratio der ausgewählten Zellen aufgezeichnet und wie oben beschrieben ausgewertet (siehe Abschnitt 2.2).

Well A	Well B	Well C	Well D
50 μl X ₁ + 450 μl Versuchspuffer	50 μl X ₂ + 450 μl Versuchspuffer	50 μl X ₃ + 450 μl Versuchspuffer	50 μl X ₄ + 450 μl Versuchspuffer

Abb.2.4.1: 4-Kammer-Deckgläser (schematisch): In Wells A-D wurden die Zellen zuerst in 450 μl Versuchspuffer für mindestens 2 Minuten durch die elektrisch Stimulation äquilibriert in denen anschließend 50 μl der vorbereiteten Grundkonzentrationen (X₁-X₄) gegeben wurden

Um Messwertschwankungen bezüglich der isolierten Kardiomyozyten und kontrollierten Substanzen auszugleichen, wurden für jede Substanz mehrere Messungen an unterschiedlichen Herzmuskelzellen-Isolationen und an unterschiedlichen Tagen durchgeführt.

Für die beiden Vorläufersubstanzen BAY 41-2272 und BAY 60-2770 wurden Messungen im Konzentrationsbereich von 10^{-11} - 10^{-5} bzw. 10^{-10} - 10^{-6} M an mindestens 3 isolierten Kardiomyozyten aus mindestens 3 unterschiedlichen Zellisolationen durchgeführt. Basierend auf den Ergebnissen der Vorläufersubstanzen wurde der Konzentrationsbereich für die Charakterisierung des inotropen und lusitropen Effektes von Riociguat und Cinaciguat auf isolierte Kardiomyozyten auf 10^{-11} - 10^{-5} bzw. 10^{-10} - 10^{-6} M festgelegt. Für die Analyse wurden hierbei mindestens 5 Kardiomyozyten aus mindestens 5 unterschiedlichen Zellisolationen herangezogen. Bei den Vergleichssubstanzen (NO-Donatoren: SIN-1-Chlorid und DEA/NO, β -Adrenorezeptor Agonisten Isoproterenol, Calcium-Antagonisten Verapamil) flossen jeweils mindestens 3 Kardiomyozyten aus 3 verschiedenen Isolationen in die Auswertung ein. Ein

Überblick über die analysierten Endkonzentrationen in der Kammer ist für die einzelnen Substanzen in Tab. 2.3.1 dargestellt.

2.5 cAMP und cGMP Radioimmunoassay

Die quantitative Bestimmung des intrazellulären cGMP- und cAMP-Gehalts in isolierten Kardiomyozyten nach Gabe von Riociguat, Cinaciguat, DEA/NO und Isoproterenol erfolgte mit Hilfe eines kompetitiven Radioimmunassays (RIA).

2.5.1 Prinzip des Radioimmunoassay

Das Prinzip des kompetitiven RIA beruht auf der Bindung eines spezifischen Antikörpers an das Zielmolekül bzw. Antigen (hier cAMP und cGMP) in Konkurrenz zum radioaktiv markierten Antigen. Dafür wird der Probe, die das gesuchte Antigen enthält, eine bestimmte Menge des radioaktiv-markierten Antigens hinzugegeben. Anschließend wird eine begrenzte Zahl des antigen-spezifischen Antikörpers hinzugefügt. Das unmarkierte Antigen aus der Probe und das zugegebene radioaktiv-markierte Antigen werden durch den spezifischen Antikörper gebunden, wobei die Affinität zum markierten und zum unmarkierten Molekül gleich ist. Durch diese kompetitive Bindung wird bei hohen Konzentrationen des Zielmoleküls in der Probe nur wenig, bei geringen Konzentrationen dagegen viel radioaktiv-markiertes Antigen gebunden. Mit Hilfe einer Standardreihe, bei der verschiedene Konzentrationen des markierten Antigens eingesetzt werden, kann so eine Quantifizierung des Zielmoleküls erfolgen.

Für die Messung des Gehalts an radioaktiv-markiertem Antigen muss zuerst noch das ungebundene überschüssige Antigen entfernt werden. Dazu wird ein sekundärer Antikörper zugegeben, der an dem vorhandenen Antigen-Antikörper Komplex bindet. Dadurch wird der Komplex soweit vergrößert, dass er mittels Zentrifugation pelletiert werden kann, während das ungebundene Antigen im Überstand verbleibt. Nach der Messung der Radioaktivität im verbliebenen Pellet kann anhand der mitgeführten Standardreihe direkt die Konzentration des Antigens in der Probe abgelesen werden.

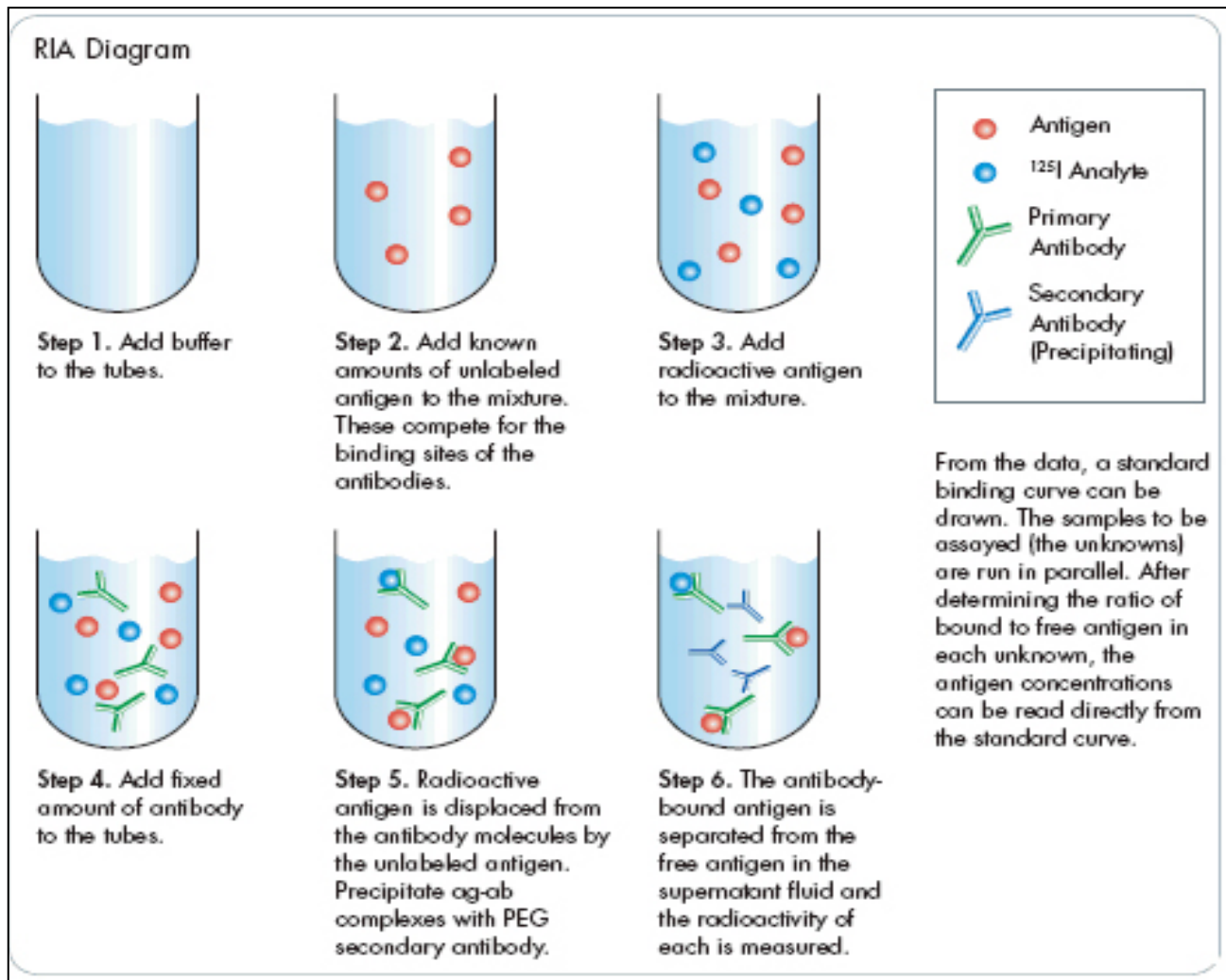


Abb. 2.5.1: Schematische Darstellung des Prinzips des kompetitiven RIA: Dieses Prinzip beruht auf der Konkurrenz eines radioaktiv markierten Antigens und des zu untersuchenden Zielmoleküls (cAMP und cGMP) zu der eine fixe Menge eines antigen-spezifischen Antikörpers gegeben wird. Bei hohen Konzentrationen des Zielmoleküls wird nur wenig, bei geringen Konzentrationen dagegen viel radioaktiv-markiertes Antigen gebunden. Zur Entfernung des überschüssigen Antigens erfolgt die Gabe eines sekundären Antikörpers. Mit Hilfe der erhaltenen Daten lässt sich eine Standardreihe ableiten¹⁶¹

2.5.2 Vorbereitung der Proben

Für die Inkubation wurden jeweils $0,5 \times 10^6$ isolierte Rattenkardiomyozyten in 10ml Versuchspuffer (117mM NaCl, 2,8mM KCl, 0,6mM MgCl₂, 1,2mM KH₂PO₄, 10mM HEPES, 1,2mM CaCl₂, pH: 7,3 bei 20°C) in 15ml Prüfröhrchen übergeführt. Um einen Abbau der zyklischen Nukleotide zu unterbinden, wurden die Zellen mit 1mM 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IMBX, Sigma-Aldrich, D), einem unspezifischen Phosphodiesterase-Hemmer, unter Schwenken bei Raumtemperatur (RT) für 10 Minuten vorinkubiert. Anschließend wurde die jeweilige Prüfsubstanz zu einer Endkonzentration von 10^{-7} M DEA/NO, 10^{-7} M Isoproterenol, 10^{-6} M Riociguat, 10^{-6} M

Cinaciguat, oder 0,01% DMSO (Lösungsmittelkontrolle) jeweils dazugegeben und die Zellen bei gleichen Bedingungen für 20 Minuten weiter inkubiert. Durch Zentrifugation für 2 Minuten (43g) und Kühlung auf Eis wurde die Inkubation beendet. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Kardiomyozyten in 1ml eiskalten 95% Ethanol/0,01 N HCl lysiert. Durch erneute Zentrifugation (10.000g) für 2 Minuten bei 4°C wurden die Zelltrümmer von den Kardiomyozyten getrennt. Das Pellet aus dieser Zentrifugation wurde zur Proteinbestimmung in 0,5ml 1% SDS/0,01 N HCl durch Inkubation für 1h bei 50°C in einem Thermomixer (Eppendorf) gelöst. Der Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und in einem Vakuum-Rotationsverdampfer bei 50°C und 1500g für 1,5 Stunden lyophilisiert. Bis zur weiteren Messung wurden die Proben bei -20°C gelagert. Für jede Prüfsubstanz wurden mindestens 3 Inkubationen mit Zellen aus unterschiedlichen Isolationen durchgeführt.

2.5.3 Durchführung der Radio-Immuno-Assays

Die Analyse der Proben erfolgte mittels eines cAMP- bzw. cGMP-spezifischen [¹²⁵I] markierten RIA (Biomedical Technologies, Stoughton, USA). Alle für die Bestimmung der zyklischen Nukleotide benötigten Reagenzien wurden durch die RIA-KITs bereitgestellt (Tab. 2.5.1).

Reagenzien	Zusammensetzung
Sonden-Puffer	Enthält Natriumacetatpuffer (pH: 6,2), Kaninchen IgG, Phosphodiesterase Inhibitoren und Natriumazid
cGMP (cAMP)-Sonde	1,5µCi (¹²⁵ I) succinyl-cGMP (cAMP)-tyrosine methylester in 50% n-Propanal in 10,5ml Sonden-Puffer verdünnen
Working-Puffer	0,05M Natriumacetat, pH 6,2
cGMP (cAMP) Standard	5000pmol lyophilisiertes IgG. in 5ml Working-Puffer lösen
cGMP (cAMP)-Antiserum	Spezifisches cGMP (cAMP)-Antiserum, enthält zusätzlich Ziege Anti-Kaninchen-IgG
Nichtspezifisches Bindungsreagenz	Entspricht Antiserum ohne spezifische cGMP (cAMP)-Antikörper

Tab. 2.5.1: Reagenzien des RIA-Kits

Die Probenaufbereitung und Messung erfolgt für beide Nukleotide identisch, daher wird im Folgenden nur die Durchführung der cGMP-Bestimmung beschrieben. Abweichungen bei der cAMP-Bestimmung sind in Klammern angegeben.

Für die cGMP-Bestimmung wurden zunächst die lyophilisierten Proben in 1ml des im KIT enthaltenen Working-Puffers (Tab. 2.5.1) mittels Ultraschall gelöst. Für die weitere Messung erfolgte die Verdünnung der Proben im Verhältnis 1:2. Die Messung entstand nach dem Protokoll für nicht-acetylierte Proben gemäß den Angaben des Herstellers. Zur Ermittlung der cGMP-Konzentration wurden 3 Kontrollen, 6 cGMP-Standards zwischen 0,1 und 20pmol sowie die unbekanntenen Proben jeweils für eine Doppelbestimmung angesetzt (Tab. 2.5.2). Die Standardreihen wurden entsprechend den Herstellerangaben täglich frisch hergestellt. Alle Ansätze wurden in Borsilikat-Reagenzgläsern hergestellt.

Reagenzglas Nr.	Beschreibung	Working-Puffer	Probe oder Standard	GMP-Sonde	cGMP-Antiserum	NSB Reagenz
1, 2	Blank			100 µl		
3, 4	NSB	100 µl		100 µl		100 µl
5, 6	B0	100 µl		100 µl	100 µl	
7, 8	0,1 pmol		100 µl	100 µl	100 µl	
9, 10	0,2 pmol		100 µl	100 µl	100 µl	
11, 12	0,5 pmol		100 µl	100 µl	100 µl	
13, 14	2,0 pmol		100 µl	100 µl	100 µl	
15, 16	10 pmol		100 µl	100 µl	100 µl	
17, 18	20 pmol		100 µl	100 µl	100 µl	
19, 20 ff.	Probe		100 µl	100 µl	100 µl	

Tab. 2.5.2: Pipettierschema für die Durchführung des cGMP-spezifischen Radioimmunoassays

In diese Reagenzgläser wurde zunächst je 100µl Working-Puffer bei der Nichtspezifischen Bindungskontrolle (NSB) und dem Null-Standard (B0), 100µl der jeweiligen cGMP-Konzentration für die Standardreihe oder 100µl der zu bestimmenden Probe pipettiert. Ein weiteres Röhrchen zur Bestimmung des Blindwertes (Blank) blieb ohne Pufferzugabe.

Anschließend erfolgte bei allen Ansätzen die Zugabe von 100µl der cGMP-Sonde. Nach Mischen der Proben durch mehrmaliges Schwenken wurden je 100µl des cGMP-Antiserums in alle Reagenzgläser mit Ausnahme des Blanks und NSB gegeben. Zur NSB-Kontrolle wurden 100µl NSB-Reagenz zugegeben. Die Ansätze wurden durch Schwenken gemischt. Mit Ausnahme des Blanks wurde in alle Ansätzen 1ml des Working-Puffer hinzugefügt und die Proben gründlich gemischt. Abschließend wurden diese für 20min bei 4°C und 2000g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das

Pellet getrocknet. Schließlich wurde die Radioaktivität der Pellets und des Blanks im β -Counter gemessen.

Zur Bestimmung einer Standardkurve erfolgte zuerst die Berechnung des Mittelwertes für alle Messpunkte. Die Mittelwerte der Messpunkte wurden von den Mittelwerten der Nicht-spezifischen Bindungen (3-4) subtrahiert. Die daraus erhaltenen Werte wurden ins prozentuale Verhältnis zum Null-Standard (5/6) gesetzt. Mit der resultierenden Standardkurve (% von B0 versus pmol cGMP/Standard) wurde die cGMP-Konzentration für die Proben ermittelt.

2.6 Proteinbestimmung

Der gemessene intrazelluläre cAMP- und cGMP-Gehalt wurde ins Verhältnis zum Proteingehalt der lysierten Zellen gesetzt. Dadurch soll der Einfluss von Schwankungen bei der Zahl der eingesetzten Zellen minimiert werden. Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte nach der BCA-Methode (Pierce Biotechnology, Rockford, USA).

2.6.1 Prinzip der Proteinbestimmung

Das Prinzip der BCA Protein Bestimmung ist die Bildung eines Komplexes der Proteine mit Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung (Biuret Reaktion). Dadurch kommt es zur Reduktion der Cu^{2+} -Ionen, welche mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Komplex bilden. Der Komplex wird photometrisch bei 562nm gemessen. Der gemessene Proteingehalt verhält sich linear proportional zur Farbreaktion. Deshalb wird eine Standardreihe mit BCA bestimmt. Aus einer BCA-Stammlösung mit einer Konzentration von 2,0mg/l wird durch serielle Verdünnung eine Standardreihe mit 0-1600 $\mu\text{g/ml}$ Proteinkonzentrationen erstellt.

2.6.2 Durchführung der Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurden 10 μl Standardlösung bzw. aus den Proben mit 200 μl Färbereagenz, bestehend aus 50 Teilen BCA Reagenz A und 1 Teil BCA Reagenz B (4% Kupfersulfat) in eine 96-Well Mikrotitrierplatte titriert. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37°C erfolgte die Messung bei 562nm am Photometer (Bop Synergy H1 Hybrid Reaker, Winsoki, USA). Für alle Proben, sowie dem Standard, wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Anhand der ermittelten Standardreihe wurde anschließend die Proteinkonzentration in den Proben ermittelt.

2.7 Statistische Auswertungen

Die durch die IonWizard Analysesoftware (IonOptix) erhaltenen Kontraktionsparameter dep v, ret v, bl % peak h und Ca^{2+} -Ratio wurden mittels Excel 2007 (Microsoft, USA) weiter ausgewertet. Für die Messwerte jeder Messreihe (Baseline, akut, nach 2 Minuten, nach 5 Minuten) wurde die prozentuale Abweichung in Bezug auf die Baseline ermittelt und daraus der Mittelwert gebildet. Die Mittelwerte gingen als Einzelmessungen in die Berechnung der Mittelwerte für die einzelnen Substanzen und Konzentrationen ein. Alle Ergebnisse aus den Kontraktilitätsmessungen sind als % von der Baseline dargestellt.

Die Ergebnisse aus dem cAMP- und cGMP-RIA sind auf dem intrazellulären Proteingehalt bezogen und für die untersuchten Substanzen der Mittelwert aus den einzelnen Inkubationen gebildet.

Die Diagramme geben, sofern nicht anders gekennzeichnet, Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) wieder.

Als statistischer Test zur Bestimmung der Signifikanz für verschiedene Gruppen wurde der nichtparametrische Rangsummentest Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben und der gepaarte t-Test für abhängige Stichproben angewendet. Die Korrelation zwischen Dosis und Wirkung wurde mittels linearer Regression überprüft. Die Unterschiede wurden als signifikant betrachtet ab $p < 0,05$. Alle Berechnungen wurden mit dem Programm Sigma Stat 3.0 (Systat Software, San Jose, Kalifornien, USA) durchgeführt.

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte als erster Schritt die Durchführung einer Vorläuferstudie zur Untersuchung der Kontraktilität und Relaxation isolierter Kardiomyozyten bei unterschiedlichen Konzentrationen vom sGC-Stimulator BAY 41-2772 und sGC-Aktivator BAY 60-2770. Auf Basis dieser Studie erfolgte die Charakterisierung der inotropen und lusitropen Eigenschaften des sGC-Stimulators BAY 63-2521 (Riociguat) bzw. des sGC-Aktivators, BAY 58-2667 (Cinaciguat) an isolierten Herzmuskelzellen. Diese wurden den Effekten von den NO-Donatoren (SIN-1 Chlorid und DEA/NO) sowie dem β -Agonisten (Isoproterenol) und dem Calcium-Antagonisten (Verapamil) gegenübergestellt.

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der Inotropie, Lusitropie und des Calcium-Transienten dargestellt. In der Auswertung wurde die Abnahme oder Zunahme der maximalen Kontraktilität (bl peak h%), Kontraktionsgeschwindigkeit (dep v), Relaxationsgeschwindigkeit (ret v) sowie des Calcium-Transienten (Ca^{2+} -Ratio) ausgewertet.

3.1 Einfluss von Isoproterenol auf die Kontraktilität und Relaxation von isolierten Kardiomyozyten

3.1.1 Inotropie

Die Gabe von Isoproterenol führte nach 2 und 5 Minuten zu einer signifikanten konzentrationsabhängigen Zunahme sowohl der maximalen Zellverkürzung (bl peak h%), wie auch der Kontraktionsgeschwindigkeit (dep v) (Abb. 3.1.1/3.1.2). Es folgte einer linearen Funktion (lineare Regression, $P_{\text{trend}} \leq 0,005$).

Die Zunahme der bl peak h% (Abb. 3.1.1) und dep v (Abb. 3.1.2) waren nach 2 und 5 Minuten ab einer Konzentration von 10^{-8}M bis 10^{-5}M signifikant mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von mindestens $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrollinkubation (0,02% DMSO). Lediglich in der niedrigsten Konzentration (10^{-9}M), zeigte sich nach 2 und 5 Minuten keine signifikanten Veränderungen der Kontraktionsgeschwindigkeit und der maximalen Kontraktilität gegenüber der Baseline. Der maximale Effekt konnte in der höchsten getesteten Konzentration (10^{-5}M) nach 2 Minuten mit einer Zunahme

von 140,58±28,90% (bl peak h%) und 181,83±36,38% (dep v) im Vergleich zu DMSO 0,02% beobachtet werden.

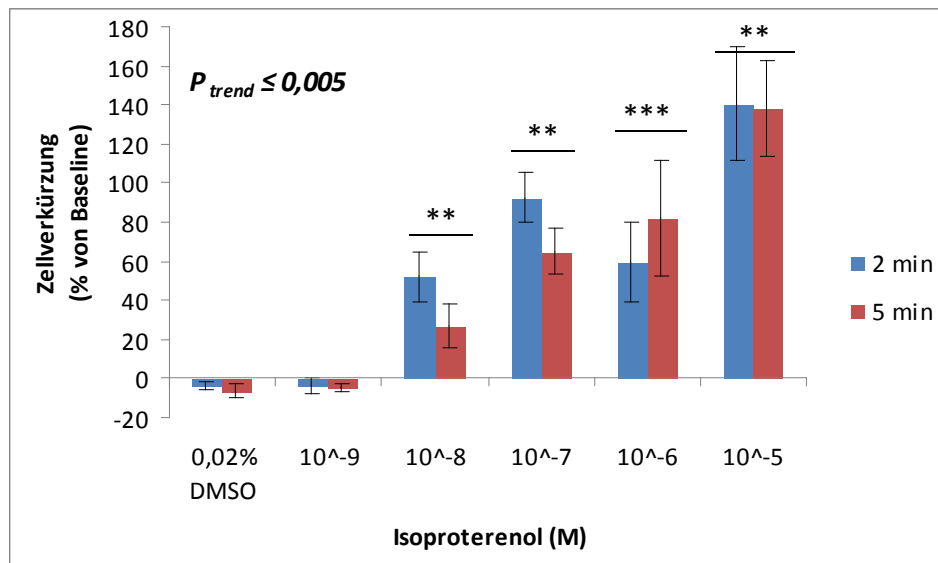


Abb. 3.1.1: Isoproterenol führt zu einer signifikanten konzentrationsabhängigen (10^{-9}M - 10^{-5}M) Zunahme der maximalen Kontraktilität nach 2 Minuten (blaue Säule) ($R^2=0,54$, $P_{\text{trend}}\leq 0,005$) und 5 Minuten (rote Säule) ($R^2=0,60$, $P_{\text{trend}}\leq 0,005$) der isolierten Rattenkardiomyozyten. Es zeigt sich für die Konzentrationen 10^{-8}M bis 10^{-5}M ein signifikanter Unterschied zu den Kontrollen. Mann-Whitney-U-Test: (): $p<0,01$, (***) : $p<0,001$ vs. Kontrolle (0,02% DMSO); $n=5-8$**

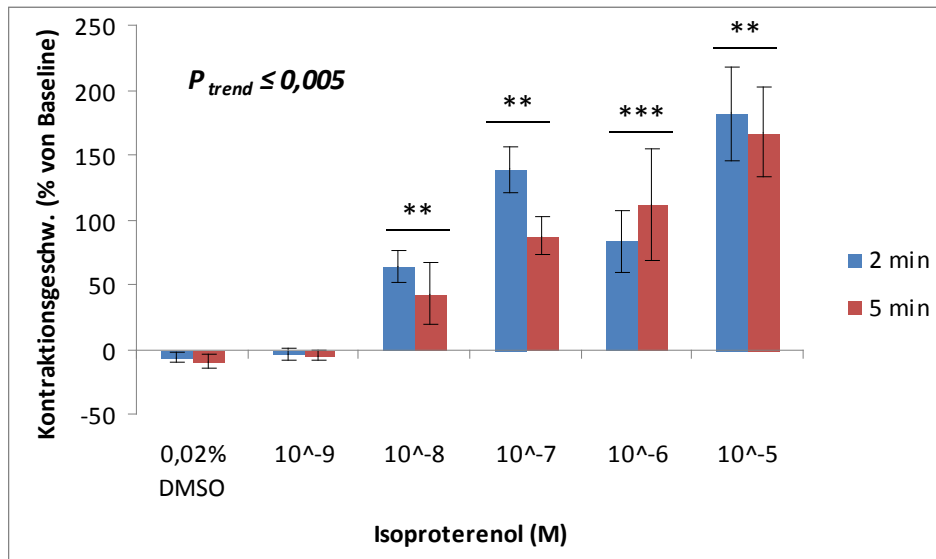


Abb. 3.1.2: Isoproterenol führt zu einer signifikanten konzentrationsabhängigen (10^{-9}M - 10^{-5}M) Zunahme der Kontraktionsgeschwindigkeit nach 2 Minuten (blaue Säule) ($R^2=0,58$, $P_{\text{trend}}\leq 0,005$) und 5 Minuten (rote Säule) ($R^2=0,59$, $P_{\text{trend}}\leq 0,005$) der isolierten Rattenkardiomyozyten. Es zeigt sich für die Konzentrationen 10^{-8}M bis 10^{-5}M ein signifikanter Unterschied zu den Kontrollen. Mann-Whitney-U-Test: (**): $p<0,01$, (***) : $p<0,001$ vs. Kontrolle (0,02% DMSO); $n=5-8$

3.1.2 Lusitropie

Nach Zugabe von Isoproterenol stellte sich im gemessenen Zeitraum von 2 und 5 Minuten eine linear konzentrationsabhängige Beschleunigung der Relaxationsgeschwindigkeit ($ret\ v$) (lineare Regression, $P_{trend} \leq 0,005$) ein (Abb. 3.1.3). Ab einer Konzentration von $10^{-8}M$ konnte eine signifikante Veränderung der $ret\ v$ gegenüber 0,02% DMSO festgestellt werden (Abb. 3.1.3).

Am stärksten war die Beschleunigung in der höchsten Konzentration nach 2 und 5 Minuten ($10^{-5}M$) um $147 \pm 30,42\%$ und $158,97 \pm 24,95\%$. In der kleinsten Konzentration konnte kein signifikanter Effekt gemessen werden (Abb. 3.1.3).

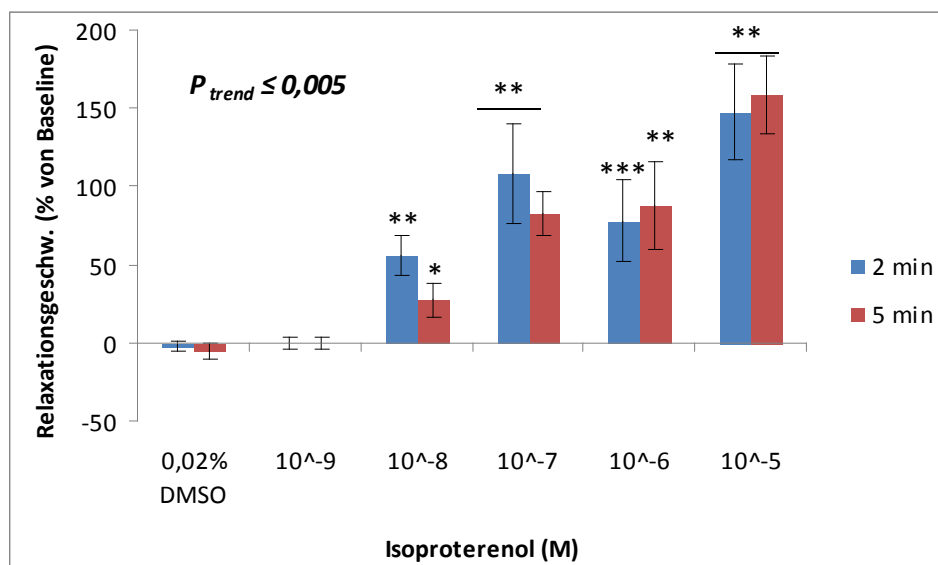


Abb. 3.1.3: Isoproterenol führt zu einer signifikanten konzentrationsabhängigen ($10^{-9}M$ - $10^{-5}M$) Zunahme der Relaxationsgeschwindigkeit nach 2 Minuten (blaue Säule) ($R^2=0,51$, $P_{trend} \leq 0,005$) und 5 Minuten (rote Säule) ($R^2=0,63$, $P_{trend} \leq 0,005$) der isolierten Rattenskardiomyozyten. Es zeigt sich für die Konzentrationen $10^{-8}M$ bis $10^{-5}M$ ein signifikanter Unterschied zu den Kontrollen. Mann-Whitney-U-Test: (*): $p < 0,05$, (**): $p < 0,01$, (***) : $p < 0,001$ vs. Kontrolle (0,02% DMSO); $n=5-8$

3.1.3 Calcium- Transient

Bezüglich des Calcium-Transients kam es in den Konzentrationen von 10^{-8}M bis 10^{-5}M im Verlauf der kompletten Messzeit zu einer signifikanten Zunahme gegenüber der Lösungsmittelkontrolle (Abb. 3.1.4). Es zeigte sich für beide Messzeitpunkte eine diskrete Konzentrationsabhängigkeit. Der Maximale Effekt wurde in der höchsten Konzentration gemessen, um $55,09\pm 8,81\%$ nach 2 und $64,31\pm 12,47\%$ nach 5 Minuten (Abb. 3.1.4). Ab 10^{-8}M waren alle Konzentrationen signifikant gegenüber 0,02% DMSO. In der Konzentration 10^{-9}M war keine Veränderung zu 0,02% DMSO nach 2 oder 5 Minuten messbar (Abb. 3.1.4).

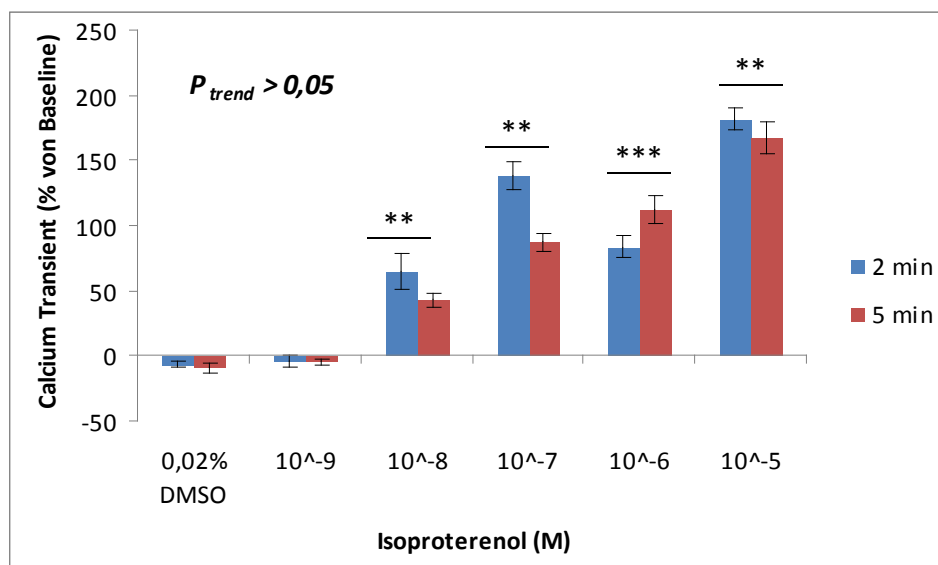


Abb. 3.1.4: Isoproterenol führt zu keiner signifikanten konzentrationsabhängigen (10^{-9}M - 10^{-5}M) Zunahme des Ca^{2+} -Transients nach 2 Minuten (blaue Säule) ($R^2=0,52$, $P_{\text{trend}}\geq 0,05$) und 5 Minuten (rote Säule) ($R^2=0,63$, $P_{\text{trend}}\geq 0,05$) der isolierten Rattenkardiomyozyten. Es zeigt sich jedoch für die Konzentrationen 10^{-8}M bis 10^{-5}M ein signifikanter Unterschied zu den Kontrollen. Mann-Whitney-U-Test: (**): $p<0,01$, (***) : $p<0,001$ vs. Kontrolle (0,02% DMSO); $n=5-8$

3.2 Einfluss von Verapamil auf die Kontraktilität und Relaxation von isolierten Kardiomyozyten

3.2.1 Inotropie

Nach Gabe von Verapamil waren sowohl die Kontraktilität als auch die Kontraktionsgeschwindigkeit linear abhängig von der Konzentration (lineare Regression, $p \leq 0,005$) und nahmen mit zunehmender Konzentration ab (Abb. 3.2.1/3.2.2). Verapamil führte nach 2 und 5 Minuten zu einer starken, signifikanten Abnahme der Kontraktilität in den Konzentrationen $10^{-7}M$ und $10^{-5}M$ (Abb. 3.2.1). Der Effekt zeigte sich in der submaximalen Konzentration schon nach 2 Minuten. Nach 5 Minuten konnte der negativ inotrope Effekt nicht weiter nachgewiesen werden. Der Effekt persistierte aber in der höchsten Konzentration.

Auf die Kontraktionsgeschwindigkeit hatte Verapamil einen ähnlichen Effekt, mit signifikanter transienter Reduktion der Geschwindigkeit in der Konzentration $10^{-6}M$ nach 2 Minuten und einer Abnahme in der Konzentration $10^{-5}M$ (Abb. 3.2.2).

Die maximale Wirkung wurde für beide Parameter nach 2 Minuten in der höchsten Konzentration gemessen, mit $-41,63 \pm 14,36\%$ bei der maximalen Kontraktilität und $-45,24 \pm 15,20\%$ bei der Kontraktionsgeschwindigkeit.

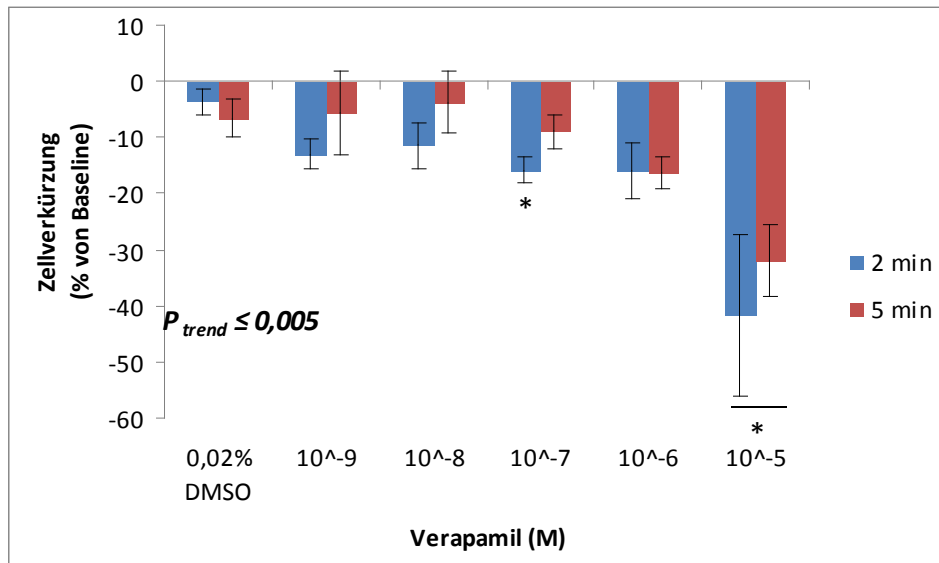


Abb. 3.2.1: Verapamil führt zu einer signifikanten konzentrationsabhängigen (10^{-9}M - 10^{-5}M) Abnahme der maximalen Kontraktilität nach 2 Minuten (blaue Säule) ($R^2=0,35$, $P_{trend} \leq 0,005$) und 5 Minuten (rote Säule) ($R^2=0,27$, $P_{trend} \leq 0,005$) der isolierten Rattenkardiomyozyten. Es zeigt sich für die Konzentrationen 10^{-7}M und 10^{-5}M ein signifikanter Unterschied zu den Kontrollen. Mann-Whitney-U-Test (*): $p < 0,05$ vs. Kontrolle (0,02% DMSO); $n=3-8$

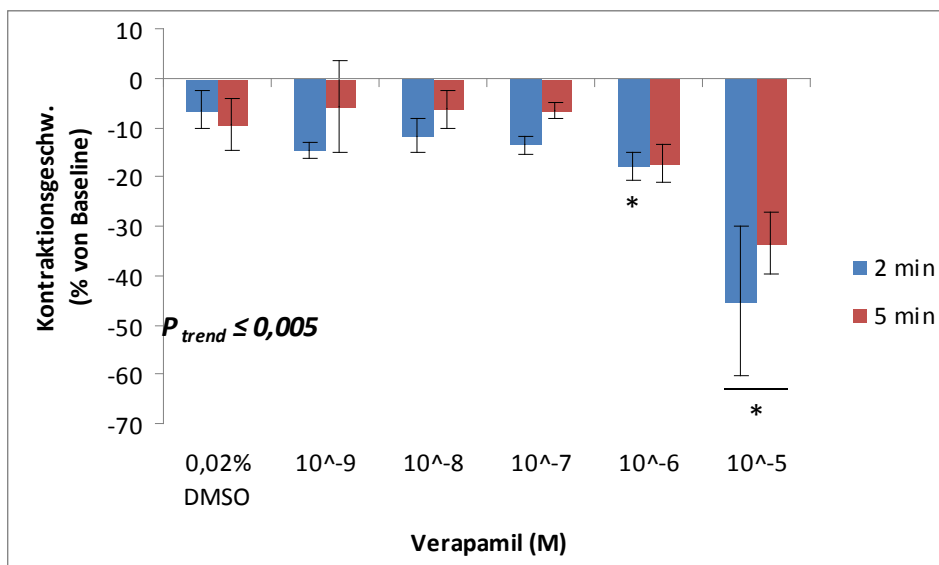


Abb. 3.2.2: Verapamil führt zu einer signifikanten konzentrationsabhängigen (10^{-9}M - 10^{-5}M) Abnahme der Kontraktionsgeschwindigkeit nach 2 Minuten (blaue Säule) ($R^2=0,32$, $P_{trend} \leq 0,005$) und 5 Minuten (rote Säule) ($R^2=0,19$, $P_{trend} \leq 0,005$) der isolierten Rattenkardiomyozyten. Es zeigt sich für die Konzentrationen 10^{-6}M nach 2 Minuten und 10^{-5}M ein signifikanter Unterschied zu den Kontrollen. Mann-Whitney-U-Test (*): $p < 0,05$ vs. Kontrolle (0,02% DMSO); $n=3-8$

3.2.2 Lusitropie

Der Effekt von Verapamil auf die Relaxation war weniger stark ausgeprägt im Vergleich zur Kontraktion. Der Einfluss von Verapamil auf die Relaxation nach 2 Minuten war linear abhängig von der Konzentration (lineare Regression, $p \leq 0,05$). Nach 5 Minuten Inkubation konnte noch eine tendenzielle lineare Abhängigkeit mit $p=0,067$ im Bezug zum gesamten Konzentrationsbereich nachgewiesen werden. Der Effekt war selbst in hohen Konzentrationen vorübergehend. Eine signifikante Reduktion der Relaxationsgeschwindigkeit konnte ausschließlich in der Konzentration $10^{-7}M$ Verapamil nach 2 Minuten gemessen werden (Abb. 3.2.3). Der maximale Effekt konnte in der höchsten Konzentration nach 2 Minuten beobachtet werden mit $-41,51 \pm 22,36\%$. Dieser war jedoch nicht signifikant.

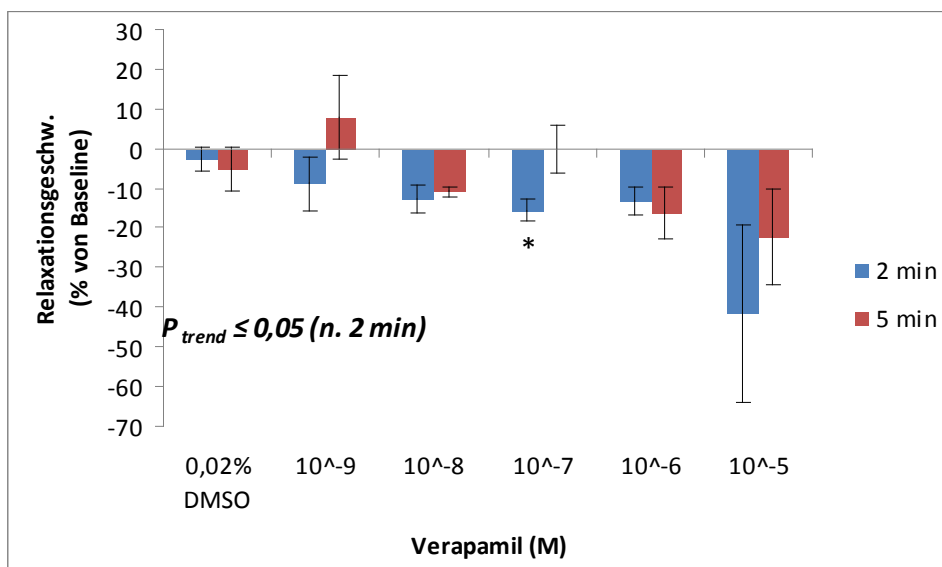


Abb. 3.2.3: Verapamil führt zu einer signifikanten konzentrationsabhängigen ($10^{-9}M$ - $10^{-5}M$) Abnahme der Relaxationsgeschwindigkeit nach 2 Minuten (blaue Säule) ($R^2=0,23$, $P_{trend} \leq 0,05$) der isolierten Rattenkardiomyozyten. Es zeigt sich für die Konzentration $10^{-7}M$ nach 2 Minuten ein signifikanter Unterschied zu den Kontrollen. Mann-Whitney-U-Test (*): $p < 0,05$ vs. Kontrolle (0,02% DMSO); $n=3-8$

3.2.3 Calcium-Transient

Hinsichtlich des Calcium-Transients konnten erst in den höchsten Konzentrationen (10^{-5}M bis 10^{-6}M) eine signifikante Abnahme beobachtet werden (Abb.3.2.4). Die Reduktion war in der Konzentration 10^{-6}M erst nach 5 Minuten Inkubation signifikant. In der Konzentration 10^{-5}M konnte eine signifikante Abnahme nach 2 und 5 Minuten persistierend gemessen werden. Der maximale Einfluss wurde nach 2 Minuten in der höchsten Konzentration mit $-25,88\pm 5,39\%$ erreicht.

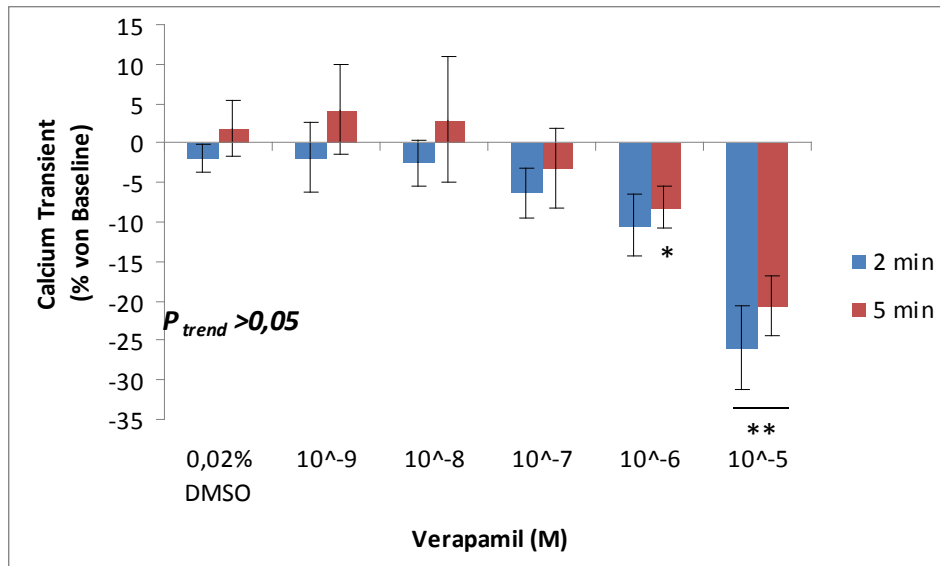


Abb.3.2.4: Verapamil führt zu keiner signifikanten konzentrationsabhängigen (10^{-9}M - 10^{-5}M) Abnahme des Ca^{2+} -Transients nach 2 Minuten (blaue Säule) ($R^2=0,40$, $P_{\text{trend}}\geq 0,05$) und 5 Minuten (rote Säule) ($R^2=0,22$, $P_{\text{trend}}\geq 0,05$) der isolierten Rattenkardiomyozyten. Es zeigt sich jedoch für die Konzentrationen 10^{-6}M nach 5 Minuten und 10^{-5}M ein signifikanter Unterschied zu den Kontrollen. Mann-Whitney-U-Test vs. Kontrolle (*): $p<0,05$, (**): $p<0,01$ vs. Kontrolle (0,02% DMSO); $n=3-8$

3.3 Einfluss von Diethylamin-Nononate (DEA/NO) auf die Kontraktilität und Relaxation von isolierten Kardiomyozyten

3.3.1 Inotropie

Nach der Gabe des NO-Donator DEA/NO konnte nur ein geringer Einfluss auf die maximale Kontraktilität (Abb. 3.3.1) beobachtet werden.

Für die maximale Zellverkürzung konnte erst mit der höchsten untersuchten Konzentration von 10^{-6} M eine signifikante, aber transiente Verminderung um $-15,58 \pm 2,55\%$ nach 2 Minuten im Vergleich zur Kontrollinkubation mit $-3,62 \pm 2,40\%$ gemessen werden (Abb. 3.3.1). Bezüglich der Kontraktionsgeschwindigkeit konnte keine signifikante Veränderung zur Baseline beobachtet werden (Abb. 3.3.2).

Es konnten für beide Parameter weder nach 2 noch nach 5 Minuten eine Konzentrationsabhängigkeit nachgewiesen werden.

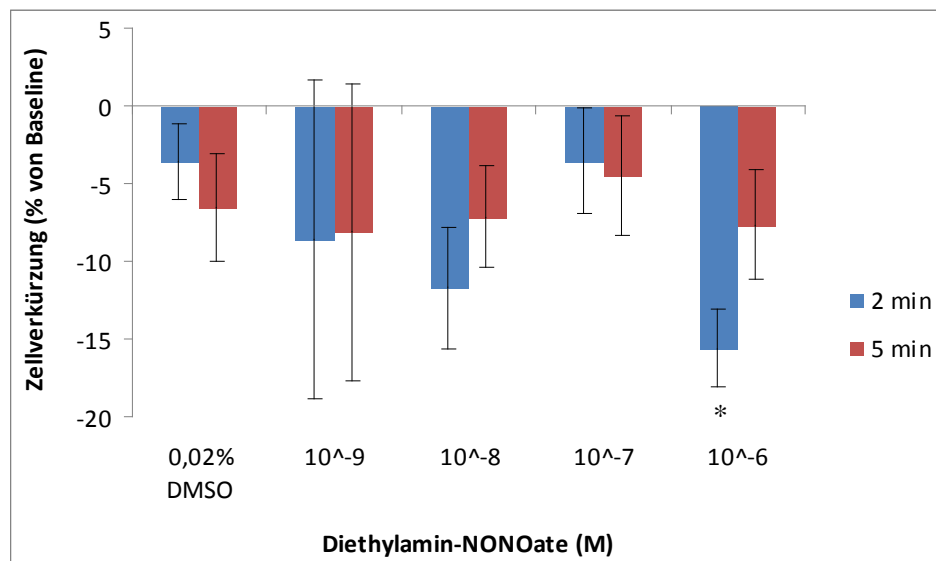


Abb. 3.3.1: Maximale Kontraktilität nach 2 Minuten (blaue Säule) und 5 Minuten (rote Säule) bei verschiedenen Konzentrationen von DEA/NO (10^{-9} M- 10^{-6} M) in isolierten Rattenkardiomyozyten, Mann-Whitney-U-Test (*): $p < 0,05$ vs. Kontrolle (0,02% DMSO); $n = 4-8$

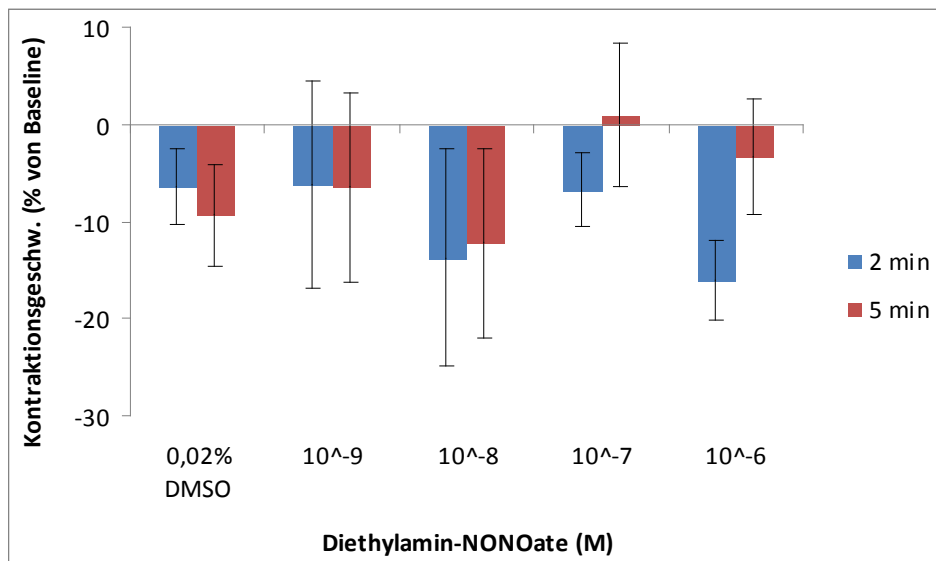


Abb. 3.3.2: Kontraktionsgeschwindigkeit nach 2 Minuten (blaue Säule) und 5 Minuten (rote Säule) bei verschiedenen Konzentrationen von DEA/NO (10^{-9} M- 10^{-6} M) in isolierten Rattenkardiomyozyten, Mann-Whitney-U-Test vs. Kontrolle (0,02% DMSO); n=4-8

3.3.2 Lusitropie

Hinsichtlich der Relaxationsgeschwindigkeit konnte unter Zugabe von DEA/NO kein signifikanter Unterschied zur Kontrollinkubation mit 0,02% DMSO gemessen werden (Abb. 3.3.3). Eine Konzentrationsabhängigkeit konnte nicht beobachtet werden.

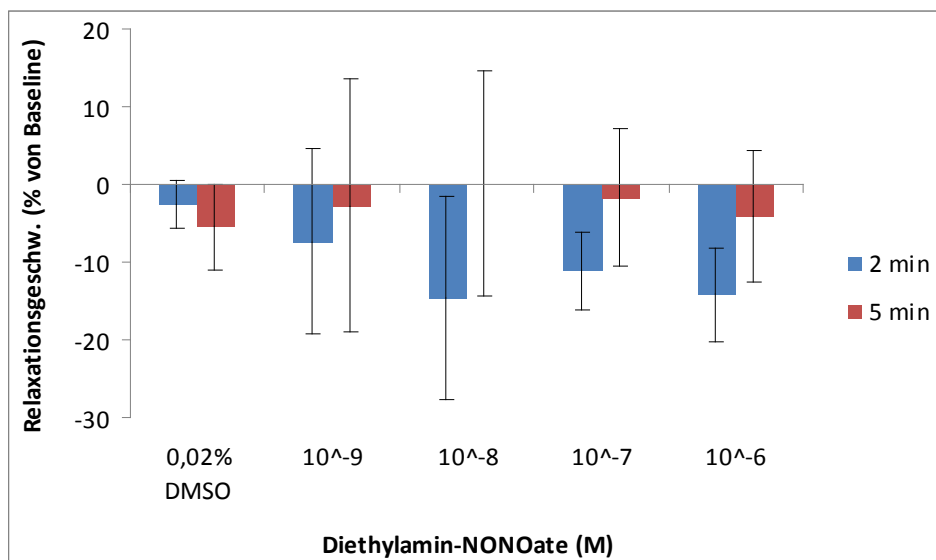


Abb. 3.3.3: Relaxationsgeschwindigkeit nach 2 Minuten (blaue Säule) und 5 Minuten (rote Säule) bei verschiedenen Konzentrationen von DEA/NO (10^{-9} M- 10^{-6} M) in isolierten Rattenkardiomyozyten, Mann-Whitney-U-Test vs. Kontrolle (0,02% DMSO); n=4-8

3.3.3 Calcium-Transient

Beim Calcium-Transienten wurde in allen Konzentrationen und über die Zeit keine signifikante Veränderung gegenüber DMSO 0,02% gemessen (Abb. 3.3.4).

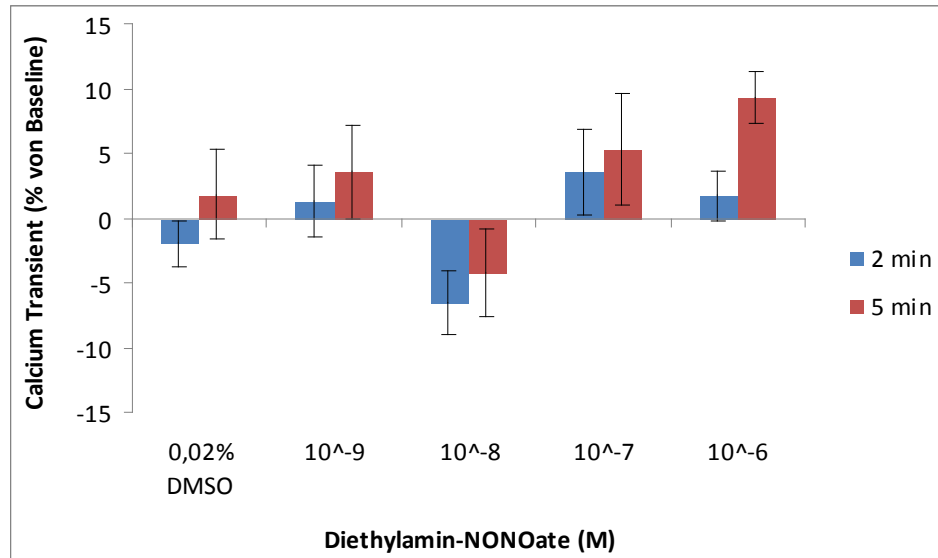


Abb. 3.3.4: Ca²⁺-Transient nach 2 Minuten (blaue Säule) und 5 Minuten (rote Säule) bei verschiedenen Konzentrationen von DEA/NO (10⁻⁹M-10⁻⁶M) in isolierten Rattenkardiomyozyten, Mann-Whitney-U-Test vs. Kontrolle (0,02% DMSO); n=4-8

3.4 Einfluss von SIN-1 Chlorid auf die Kontraktilität und Relaxation von isolierten Kardiomyozyten

3.4.1 Inotropie

Vergleichbar mit dem NO-Donator DEA/NO konnte auch mit SIN-1 Chlorid kein signifikanter Effekt auf die maximale Zellverkürzung (Abb. 3.4.1) und der Kontraktionsgeschwindigkeit (Abb. 3.4.2) im Vergleich zur Kontrolle (Versuchspuffer) gemessen werden. Eine signifikante Konzentrationsabhängigkeit wurde ebenfalls nicht nachgewiesen.

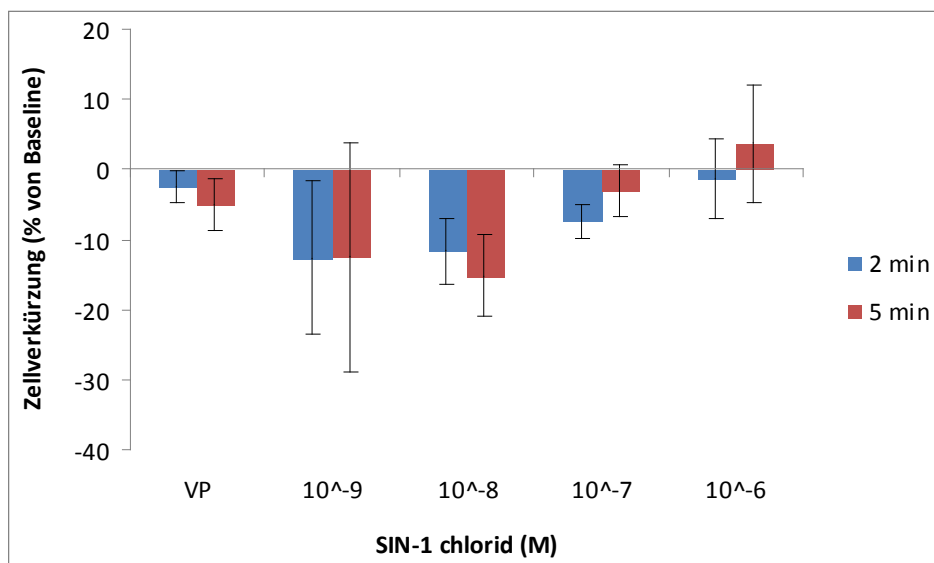


Abb. 3.4.1: Maximale Kontraktilität nach 2 Minuten (blaue Säule) und 5 Minuten (rote Säule) bei verschiedenen Konzentrationen von SIN-1 Chlorid (10^{-9} M- 10^{-6} M) in isolierten Rattenkardiomyozyten, Mann-Whitney-U-Test vs. Kontrolle (Versuchspuffer); n=3-9

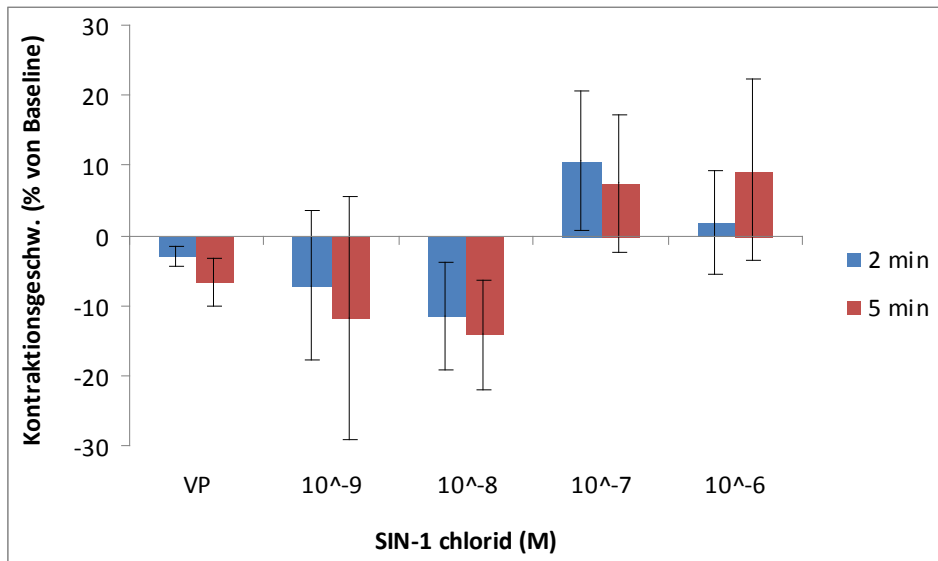


Abb. 3.4.2: Kontraktionsgeschwindigkeit nach 2 Minuten (blaue Säule) und 5 Minuten (rote Säule) bei verschiedenen Konzentrationen von SIN-1 Chlorid (10^{-9}M - 10^{-6}M) in isolierten Rattenkardiomyozyten, Mann-Whitney-U-Test vs. Kontrolle (Versuchspuffer); n=3-9

3.4.2 Lusitropie

Analog zum inotropen Effekt des NO-Donators zeigte sich bezüglich der Relaxationsgeschwindigkeit (Abb. 3.4.3) ebenfalls kein Effekt. Eine Abhängigkeit von der Konzentration lag entsprechend nicht vor.

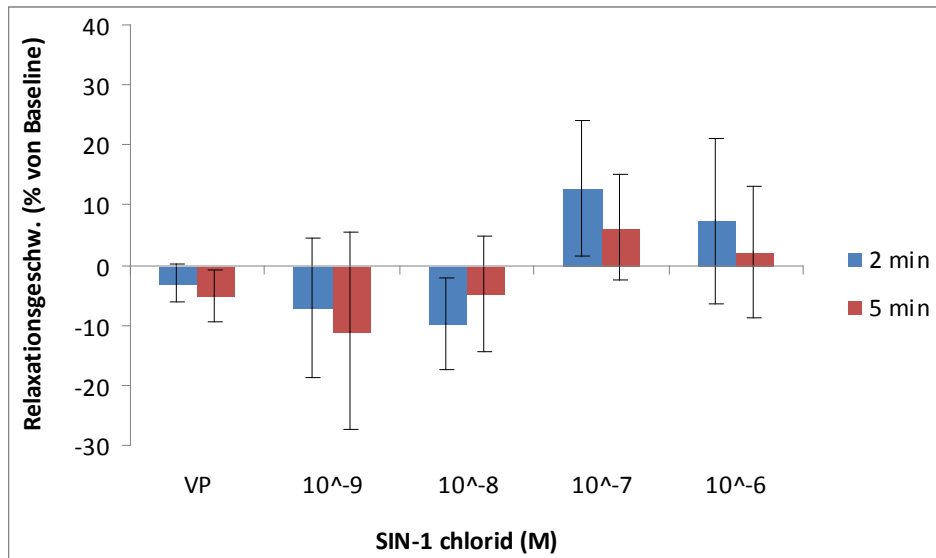


Abb. 3.4.3: Relaxationsgeschwindigkeit nach 2 Minuten (blaue Säule) und 5 Minuten (rote Säule) bei verschiedenen Konzentrationen von SIN-1 Chlorid (10⁻⁹M-10⁻⁶M) in isolierten Rattenkardiomyozyten, Mann-Whitney-U-Test vs. Kontrolle (Versuchspuffer); n=3-9

3.4.3 Calcium-Transient

Bezüglich des Calcium-Transients konnte für keine der verwendeten Konzentrationen nach 2 und 5 Minuten ein signifikanter Effekt von SIN-1 Chlorid im Vergleich zur Kontrollinkubation (Abb. 3.4.4) detektiert werden.

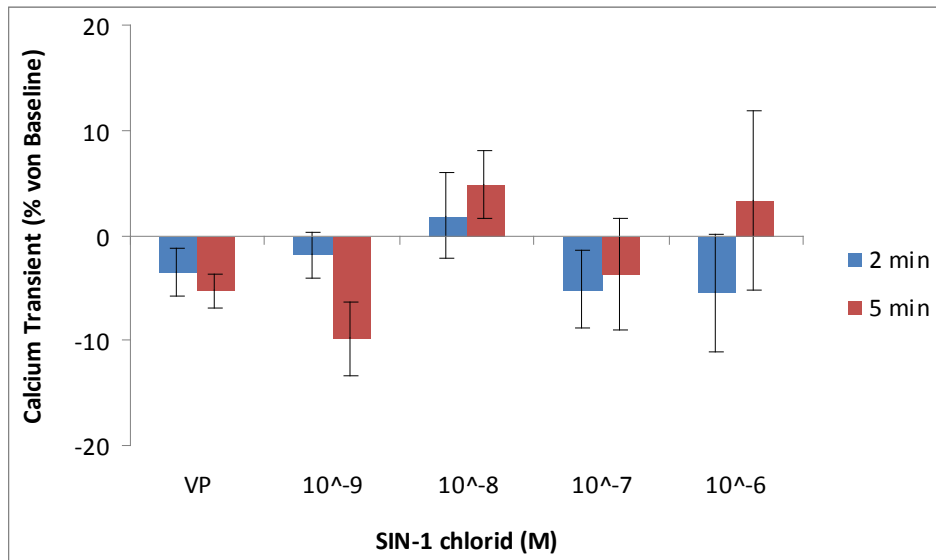


Abb. 3.4.4: Calcium-Transient nach 2 Minuten (blaue Säule) und 5 Minuten (rote Säule) bei verschiedenen Konzentrationen von SIN-1 Chlorid (10^{-9}M - 10^{-6}M) in isolierten Rattenkardiomyozyten, Mann-Whitney-U-Test vs. Kontrolle (Versuchspuffer); n=3-9

3.5 Einfluss von BAY 41-2772 auf die Kontraktilität und Relaxation von isolierten Kardiomyozyten

3.5.1 Inotropie

Der NO-unabhängige, häm-abhängige sGC-Stimulator BAY 41-2272 induzierte bei isolierten Kardiomyozyten eine Zunahme der Kontraktilität in den Konzentrationen von 10^{-6}M und 10^{-5}M (Abb. 3.5.1). Diese Zunahme war 2 Minuten nach Zugabe für beide Konzentrationen im Vergleich zur Kontrollinkubation signifikant. Nach 5 Minuten konnte nur noch in der submaximalen Konzentration 10^{-6}M eine signifikante Erhöhung gemessen werden. Der maximale Effekt konnte in der Konzentration 10^{-6}M nach 5 Minuten nachgewiesen werden (Zunahme um $19,12 \pm 4,67\%$ versus Baseline) (Abb. 3.5.1). Eine eindeutige Korrelation zur Konzentration konnte nicht festgestellt werden. Nach 2 Minuten lag jedoch eine deutliche, wenn auch nicht signifikante Tendenz, mit $p=0,065\%$ vor.

Für die Kontraktionsgeschwindigkeit konnte eine signifikante Zunahme nach 2 Minuten Inkubation in den beiden höchsten Konzentrationen gemessen werden (Abb. 3.5.2). Für diesen Messzeitpunkt war der Effekt signifikant konzentrationsabhängig (lineare Regression, $p \leq 0,05$).

Nach 5 Minuten konnten keine signifikanten Veränderungen mehr zur Kontrollinkubation festgestellt werden. Eine Konzentrationsabhängigkeit lag ebenfalls nicht vor.

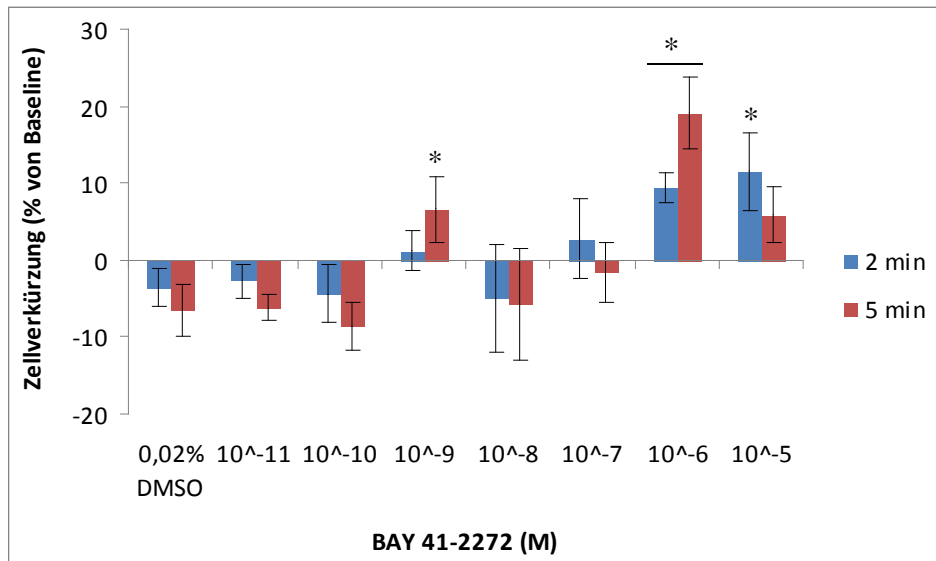


Abb. 3.5.1: Maximale Kontraktilität nach 2 (blaue Säule) und 5 Minuten (rote Säule) bei verschiedenen Konzentrationen von BAY 41-2272 (10⁻¹¹M-10⁻⁵M) in isolierten Rattenkardiomyozyten, Mann-Whitney-U-Test (*): p<0,05vs. Kontrolle (0,02% DMSO); n=2-8

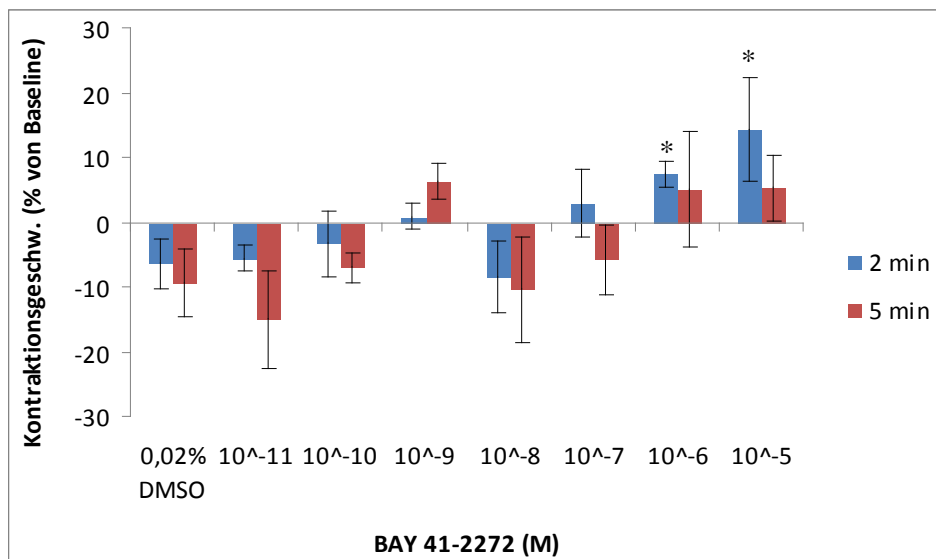


Abb. 3.5.2: Kontraktionsgeschwindigkeit nach 2 (blaue Säule) und 5 Minuten (rote Säule) bei verschiedenen Konzentrationen von BAY 41-2272 (10⁻¹¹M-10⁻⁵M) in isolierten Rattenkardiomyozyten, Mann-Whitney-U-Test (*): p<0,05 vs. Kontrolle (0,02% DMSO); n=2-8

3.5.2 Lusitropie

Bei den hohen Konzentrationen konnte nach 2 Minuten Inkubationszeit eine signifikante Zunahme der Relaxationsgeschwindigkeit im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden (Abb. 3.5.3). Der Effekt in der submaximalen Konzentration persistierte und war nach 5 Minuten signifikant erhöht gegenüber der Kontrollinkubation. Dabei zeigte sich auch der maximale Effekt mit $25,50 \pm 3,60\%$ zur Baseline. Eine signifikante Korrelation zur Konzentration lag für die Relaxationsgeschwindigkeit nach 5 Minuten vor, jedoch nicht nach 2 Minuten (lineare Regression $p \leq 0,05$).

Der stärkere Effekt auf die Relaxations- als auf die Kontraktionsgeschwindigkeit ist womöglich ein Hinweis dafür, dass die Zunahme der maximalen Kontraktilität am ehesten auf eine lusitrope Wirkung von BAY 41-2272 zurückzuführen ist.

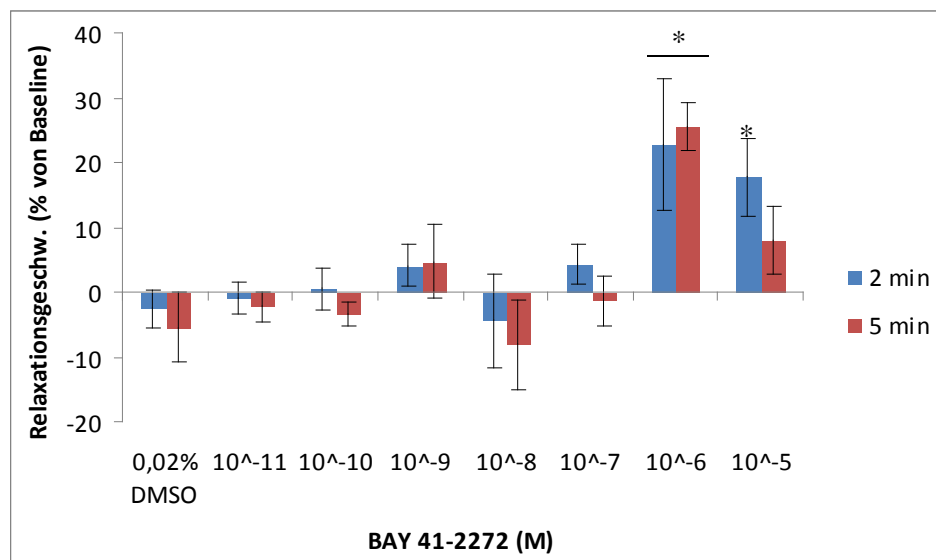


Abb. 3.5.3: Relaxationsgeschwindigkeit nach 2 (blaue Säule) und 5 Minuten (rote Säule) bei verschiedenen Konzentrationen von BAY 41-2272 (10^{-11} M- 10^{-5} M) in isolierten Rattenkardiomyozyten, Mann-Whitney-U-Test (*): $p < 0,05$ vs. Kontrolle (0,02% DMSO); n=2-8

3.5.3 Calcium-Transient

Hinsichtlich des Calcium-Transients kam es zu keiner gerichteten Veränderung des Transients (Abb. 3.5.4). Lediglich in der niedrigsten Konzentration 10^{-11} M konnte eine signifikante transiente Zunahme nach 2 Minuten beobachtet werden (Abb. 3.5.4). Eine Konzentrationsabhängigkeit lag für beide Messzeitpunkte nicht vor.

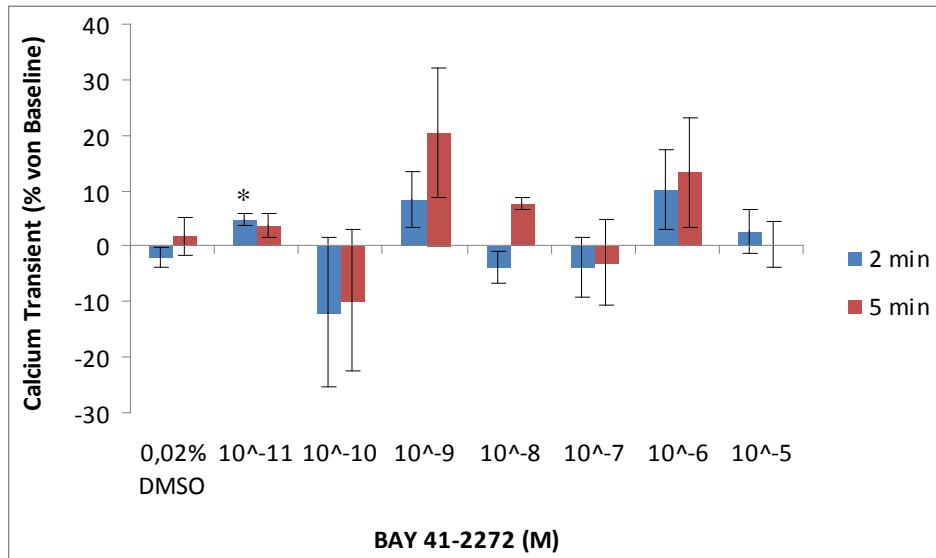


Abb. 3.5.4: Ca^{2+} -Transient nach 2 (blaue Säule) und 5 Minuten (rote Säule) bei verschiedenen Konzentrationen von BAY 41-2272 (10^{-11} M- 10^{-5} M) in isolierten Rattenkardiomyozyten, Mann-Whitney-U-Test (*): $p < 0,05$ vs. Kontrolle (0,02% DMSO); $n = 2-8$

3.6 Einfluss von Riociguat auf die Kontraktilität und Relaxation von isolierten Kardiomyozyten

3.6.1 Inotropie

Der NO-unabhängige, häm-abhängige sGC-Stimulator Riociguat wies in keiner der untersuchten Konzentrationen (von 10^{-10} M bis 10^{-5} M) eine signifikante Veränderung der zellulären Verkürzung (Abb. 3.6.1) oder Kontraktionsgeschwindigkeit (Abb. 3.6.2) bei isolierten Kardiomyozyten im Vergleich zur Kontrolle (0,01% DMSO) auf. Eine Abhängigkeit zur Konzentration konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

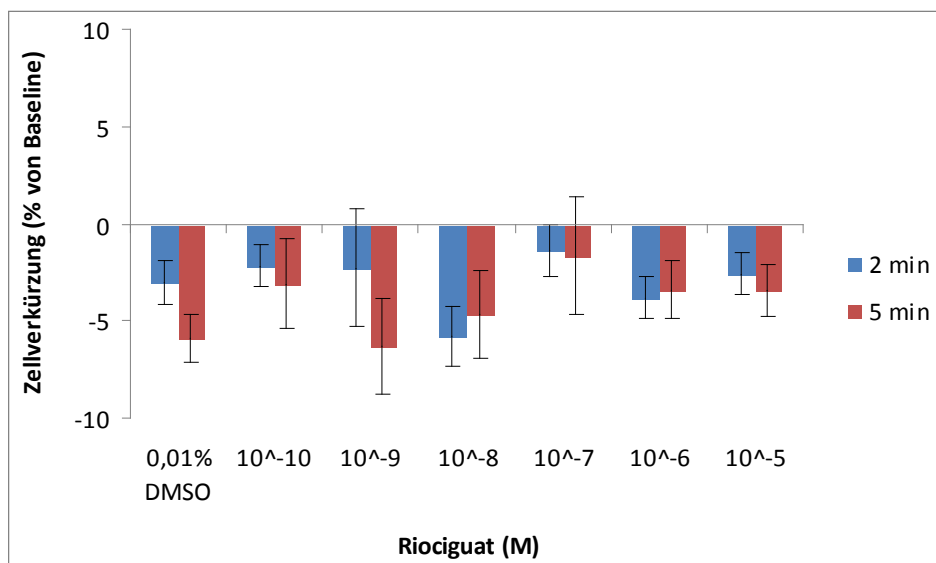


Abb. 3.6.1: Maximale Kontraktilität nach 2 Minuten (blaue Säule) und 5 Minuten (rote Säule) bei verschiedenen Konzentrationen von Riociguat (10^{-10} M- 10^{-5} M) in isolierten Rattenkardiomyozyten vs. Kontrolle (0,01% DMSO); n=5-20

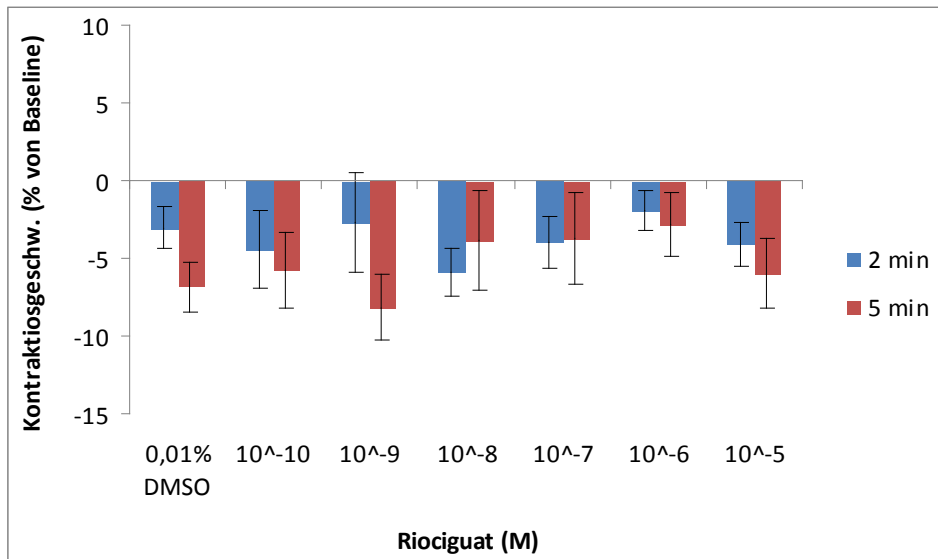


Abb. 3.6.2: Kontraktionsgeschwindigkeit nach 2 Minuten (blaue Säule) und 5 Minuten (rote Säule) bei verschiedenen Konzentrationen von Riociguat (10^{-10}M - 10^{-5}M) in isolierten Rattenkardiomyozyten vs. Kontrolle (0,01% DMSO); n=5-20

3.6.2 Lusitropie

Die Relaxationsgeschwindigkeit (Abb. 3.6.3) bleibt ebenfalls in allen Konzentrationen (10^{-10}M bis 10^{-5}M) sowohl nach 2 als auch nach 5 Minuten unverändert gegenüber dem Effekt von 0,01% DMSO. Eine Konzentrationsabhängigkeit lag nicht vor.

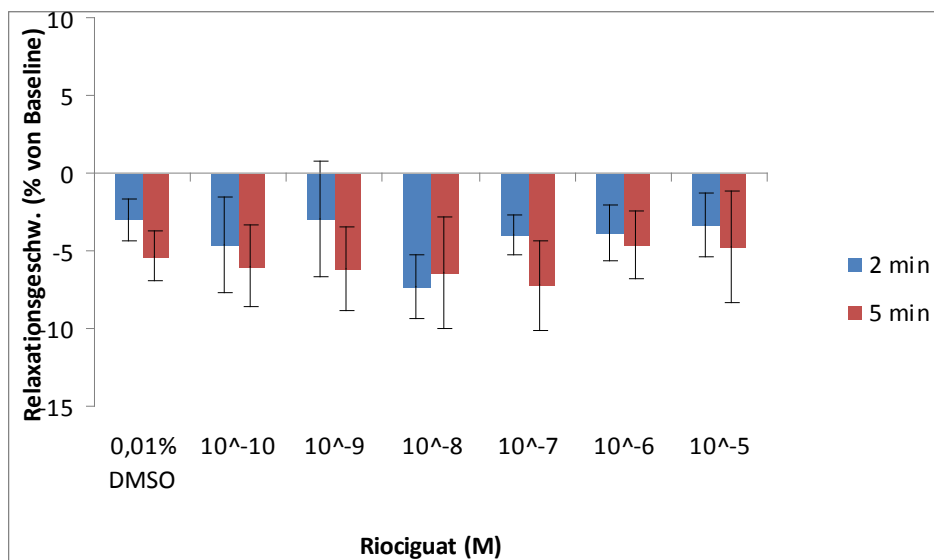


Abb. 3.6.3: Relaxationsgeschwindigkeit nach 2 Minuten (blaue Säule) und 5 Minuten (rote Säule) bei verschiedenen Konzentrationen von Riociguat (10^{-10}M - 10^{-5}M) in isolierten Rattenkardiomyozyten vs. Kontrolle (0,01% DMSO); n=5-20

3.6.3 Calcium-Transient

Der Calcium-Transient war nach Zugabe von Riociguat in den Konzentrationen 10^{-10} M bis 10^{-5} M nach 2 und 5 Minuten nicht signifikant verändert im Vergleich zu 0,01% DMSO (Abb. 3.6.4).

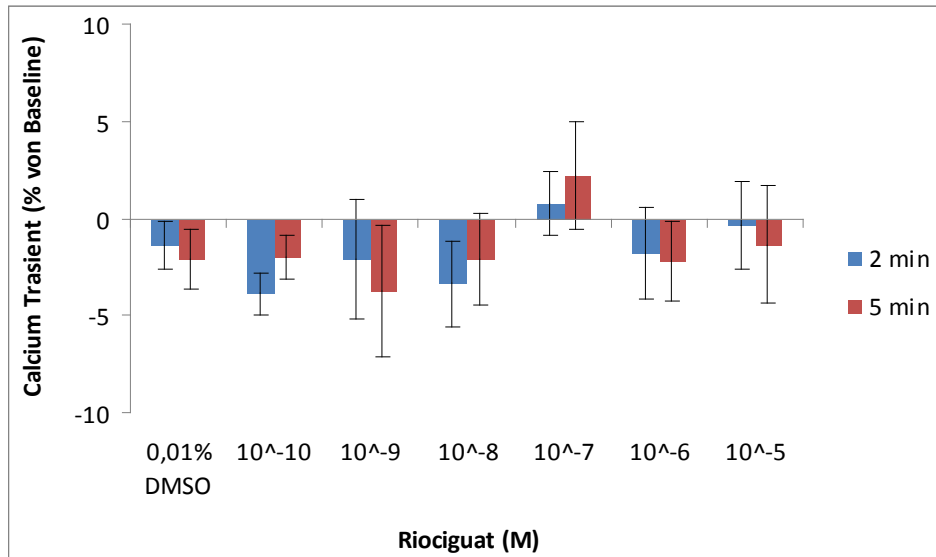


Abb. 3.6.4: Ca^{2+} -Transient nach 2 Minuten (blaue Säule) und 5 Minuten (rote Säule) bei verschiedenen Konzentrationen von Riociguat (10^{-10} M- 10^{-5} M) in isolierten Rattenkardiomyozyten vs. Kontrolle (0,01% DMSO); n=5-20

3.7 Einfluss von BAY 60-2770 auf die Kontraktilität und Relaxation von isolierten Kardiomyozyten

3.7.1 Inotropie

Der NO- und häm-unabhängige sGC-Aktivator BAY 60-2770 wies keinen signifikanten Effekt auf die Kardiomyozyten in Bezug auf die maximale Zellverkürzung im Vergleich zur Baseline (0,02% DMSO) auf (Abb. 3.7.1). Eine Konzentrationsabhängigkeit konnte nicht nachgewiesen werden.

Die Kontraktionsgeschwindigkeit verhielt sich ähnlich und damit ohne deutliche Veränderung in fast allen gemessenen Konzentrationen (Abb. 3.7.2). Lediglich in der niedrigen Konzentration 10^{-11} M konnte nach 5 Minuten Inkubation eine signifikante Akzeleration im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Eine Korrelation zur Konzentration war nicht nachweisbar.

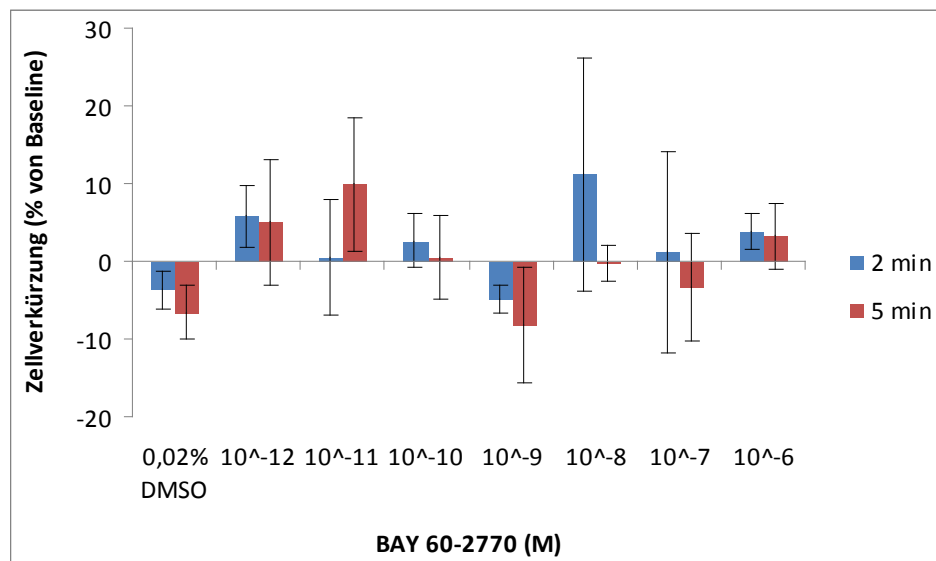


Abb. 3.7.1: Maximale Kontraktilität nach 2 Minuten (blaue Säule) und 5 Minuten (rote Säule) bei verschiedenen Konzentrationen von BAY 60-2770 (10^{-12} M- 10^{-6} M) in isolierten Rattenkardiomyozyten vs. Kontrolle (0,02% DMSO); n=2-8

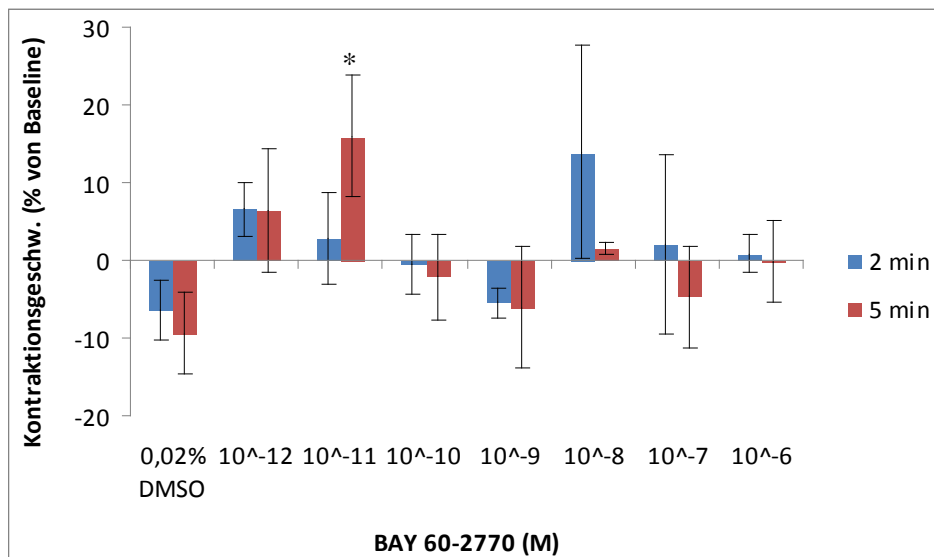


Abb. 3.7.2: Kontraktionsgeschwindigkeit nach 2 Minuten (blaue Säule) und 5 Minuten (rote Säule) bei verschiedenen Konzentrationen von BAY 60-2770 (10^{-12}M - 10^{-6}M) in isolierten Rattenkardiomyozyten, Mann-Whitney-U-Test (*): $p < 0,05$ vs. Kontrolle (0,02% DMSO); $n=2-8$

3.7.2 Lusitropie

Vergleichbar mit den Ergebnissen der Kontraktionsgeschwindigkeit, konnte für BAY 60-2770 kein Einfluss auf die Relaxationsgeschwindigkeit isolierter Kardiomyozyten nachgewiesen werden (Abb. 3.7.3). Eine Korrelation mit den eingesetzten Konzentrationen konnte nicht demonstriert werden.

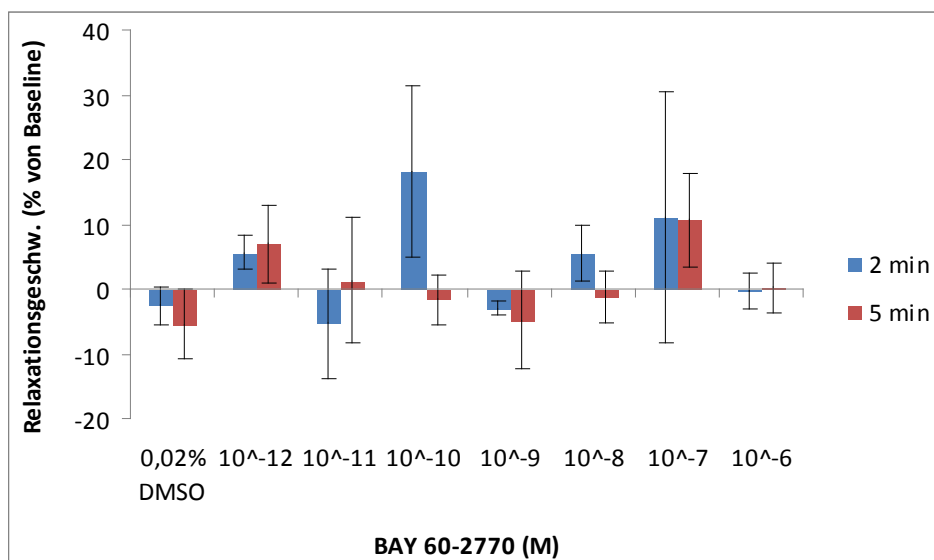


Abb. 3.7.3: Relaxationsgeschwindigkeit nach 2 Minuten (blaue Säule) und 5 Minuten (rote Säule) bei verschiedenen Konzentrationen von BAY 60-2770 (10^{-12}M - 10^{-6}M) in isolierten Rattenkardiomyozyten vs. Kontrolle (0,02% DMSO); $n=2-8$

3.7.3 Calcium-Transient

Einen eindeutigen Effekt auf den Calcium-Transienten konnte nach Gabe von BAY 60-2770 in den beobachteten Konzentrationen im Vergleich zur Kontrollinkubation nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.7.4). Lediglich eine transiente Veränderung in den Konzentrationen 10^{-9}M nach 5 Minuten und 10^{-6}M nach 2 Minuten konnte gezeigt werden, mit $-12,60\pm 3,84\%$ bzw. $7,66\pm 1,79\%$ versus Baseline.

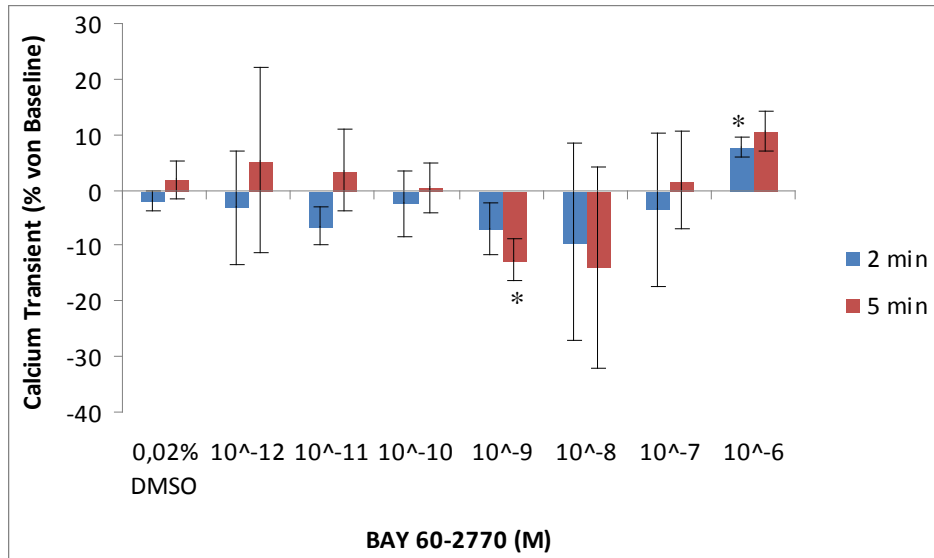


Abb. 3.7.4: Ca^{2+} -Transient nach 2 Minuten (blaue Säule) und 5 Minuten (rote Säule) bei verschiedenen Konzentrationen von BAY 60-2770 (10^{-12}M - 10^{-6}M) in isolierten Rattenkardiomyozyten, Mann-Whitney-U-Test (*): $p < 0,05$ vs. Kontrolle (0,02% DMSO); $n=2-8$

3.8 Einfluss von Cinaciguat auf die Kontraktilität und Relaxation von isolierten Kardiomyozyten

3.8.1 Inotropie

Bezogen auf die Zellverkürzung (Abb. 3.8.1) und die Kontraktionsgeschwindigkeit (Abb. 3.8.2) konnte für Cinaciguat in keiner Konzentration weder nach 2 noch nach 5 Minuten ein signifikanter Effekt im Vergleich zur DMSO-Kontrolle nachgewiesen werden. Eine Dosisabhängigkeit war für keinen der beiden Messparameter nachweisbar.

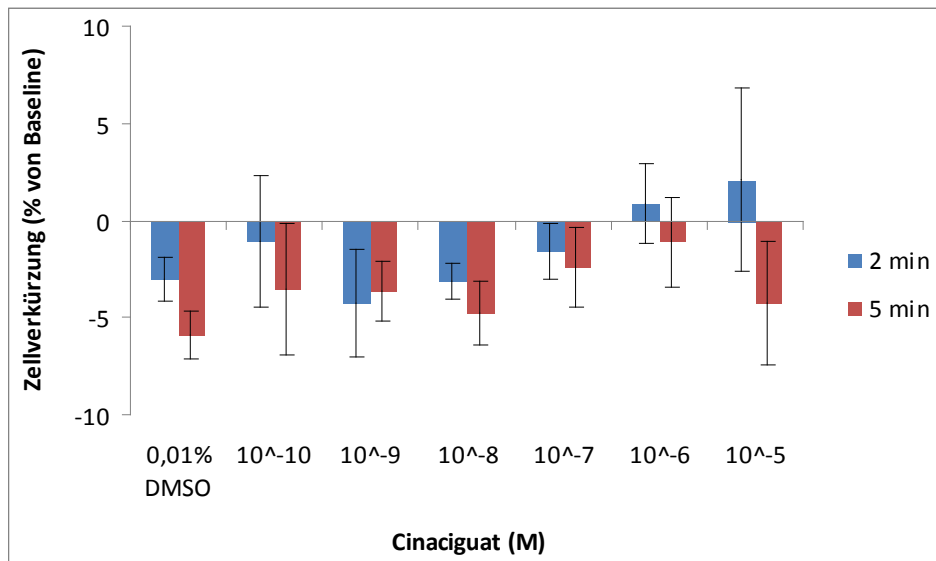


Abb. 3.8.1: Maximale Kontraktilität nach 2 Minuten (blaue Säule) und 5 Minuten (rote Säule) bei verschiedenen Konzentrationen von Cinaciguat (10^{-10}M - 10^{-5}M) in isolierten Rattenkardiomyozyten vs. Kontrolle (0,01% DMSO); n=5-20

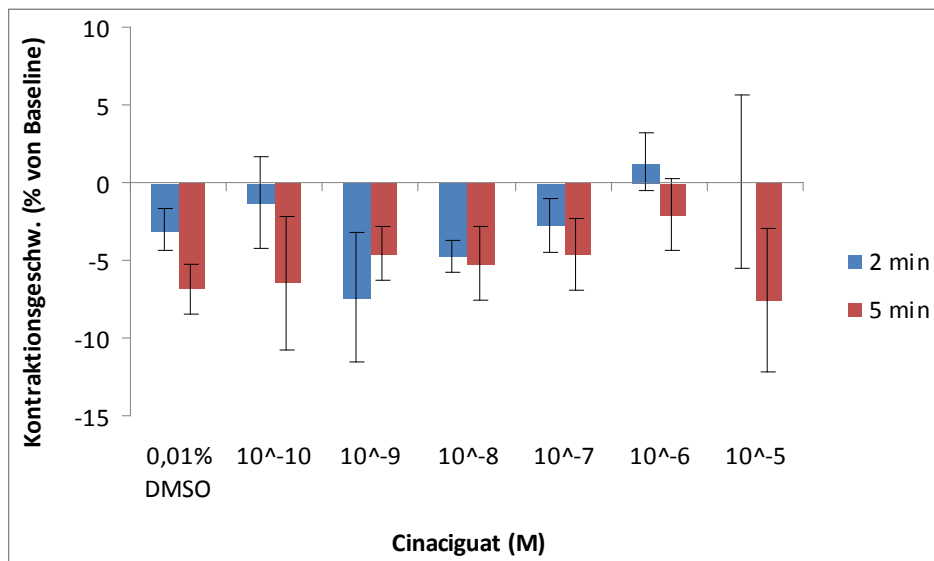


Abb. 3.8.2: Kontraktionsgeschwindigkeit nach 2 Minuten (blaue Säule) und 5 Minuten (rote Säule) bei verschiedenen Konzentrationen von Cinaciguat (10^{-10}M - 10^{-5}M) in isolierten Rattenkardiomyozyten vs. Kontrolle (0,01% DMSO); n=5-20

3.8.2 Lusitropie

Vergleichbar mit den inotropen Effekten von Cinaciguat, blieben die Messwerte der Relaxationsgeschwindigkeit (Abb. 3.8.3) in allen Konzentrationen (10^{-10}M bis 10^{-5}M) nach 2 und 5 Minuten unverändert gegenüber dem lusitropen Effekt von 0,01% DMSO. Eine Korrelation mit der Dosis konnte nicht festgestellt werden.

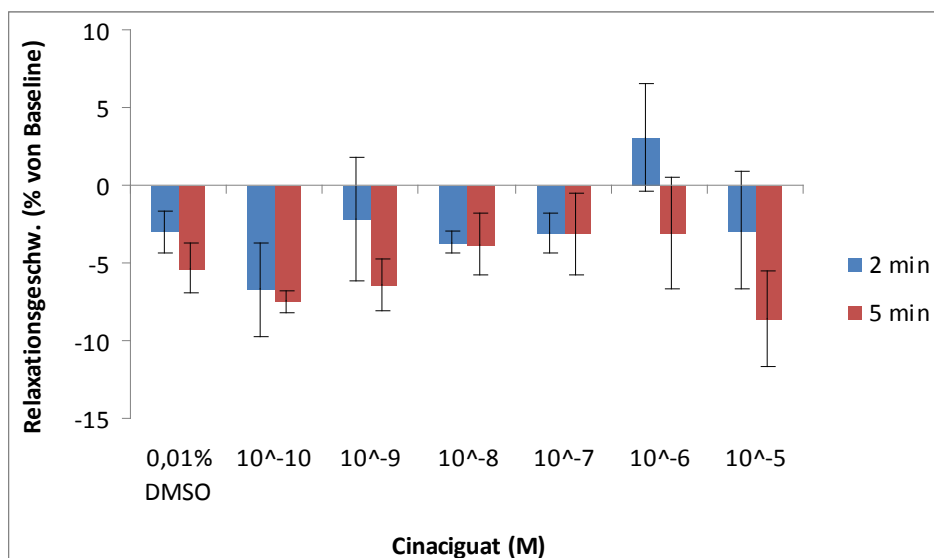


Abb. 3.8.3: Relaxationsgeschwindigkeit nach 2 Minuten (blaue Säule) und 5 Minuten (rote Säule) bei verschiedenen Konzentrationen von Cinaciguat (10^{-10}M - 10^{-5}M) in isolierten Rattenkardiomyozyten vs. Kontrolle (0,01% DMSO); n=5-20

3.8.3 Calcium-Transient

Der sGC-Aktivator Cinaciguat zeigte in keiner der untersuchten Konzentration einen signifikanten Einfluss auf den Calcium-Transienten isolierter Kardiomyozyten im Vergleich zur Kontrolle mit 0,01% DMSO (Abb. 3.8.4). Eine Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration war ebenfalls nicht nachweisbar.

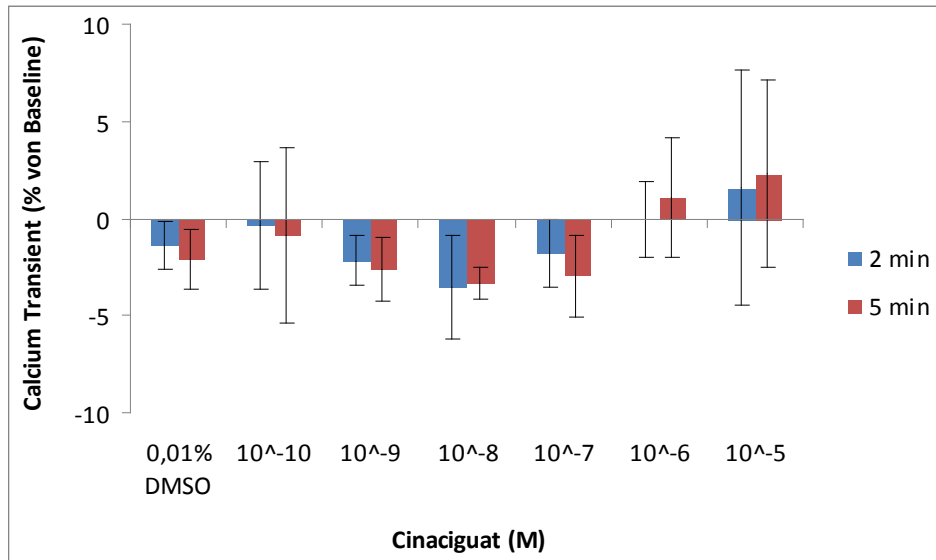


Abb. 3.8.4: Ca²⁺-Transient nach 2 Minuten (blaue Säule) und 5 Minuten (rote Säule) bei verschiedenen Konzentrationen von Cinaciguat (10⁻¹⁰M-10⁻⁵M) in isolierten Rattenkardiomyozyten vs. Kontrolle (0,01% DMSO); n=5-20

3.9 cGMP und cAMP-Gehalt in den Kardiomyozyten nach Gabe von Riociguat, Cinaciguat, DEA/NO und Isoproterenol

Zusätzlich zu den inotropen und lusitropen Effekten, wurde der Einfluss des sCG-Aktivators Cinaciguat, des sGC-Stimulators Riociguat, des NO-Donators DEA/NO und von Isoproterenol auf den intrazellulären cAMP- und cGMP-Gehalt von Kardiomyozyten überprüft.

3.9.1 cAMP

Nach der Behandlung mit Isoproterenol (10^{-6} M) produzierten die isolierten Kardiomyozyten nach 20 Minuten Inkubation eine signifikant höhere Konzentration von cAMP, um den Faktor $22,4 \pm 4,74$ im Vergleich zur Kontrollinkubation (0,01% DMSO). Bei der Inkubation mit Riociguat, Cinaciguat sowie DEA/NO konnte keine signifikante Steigerung des intrazellulären cAMP-Gehalts im Bezug zur Kontrolle induziert werden (Abb. 3.9.1).

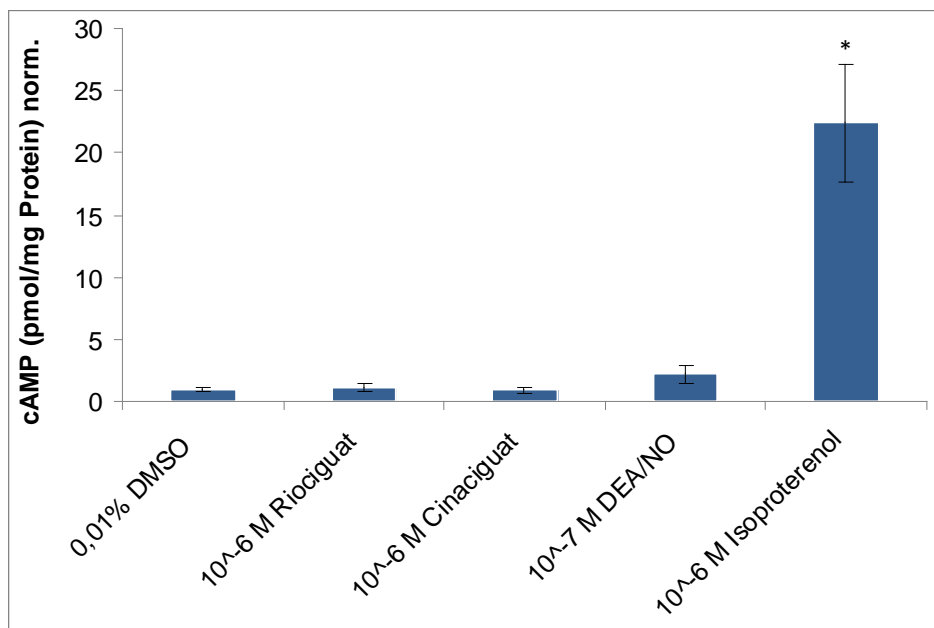


Abb. 3.9.1: Intrazelluläre cAMP-Konzentration nach Inkubation mit verschiedenen Prüfsubstanzen. Die Messung erfolgte mittels RIA nach 20 Minuten Inkubation mit der jeweiligen Prüfsubstanz. Die Daten sind bezogen auf den zellulären Proteingehalt und normalisiert gegen die jeweilige Kontrollinkubation mit 0,01% DMSO. *signifikanter Unterschied zur Kontrollinkubation (gepaarter t-Test, $p < 0,05$; $n = 3-4$)

3.9.2 cGMP

Riociguat und Cinaciguat zeigten in Bezug auf den intrazellulären cGMP-Spiegel einen signifikanten Anstieg um den Faktor $1,97 \pm 0,36$ ($4,22 \pm 0,77$ pmol/cGMP/mg protein) bzw. $1,66 \pm 0,43$ ($3,37 \pm 0,55$ pmol/cGMP/mg protein) im Vergleich zur Kontrolle mit 0,01% DMSO ($1,87 \pm 0,45$ pmol/cGMP/mg protein) (Abb.3.9.2). Darüber hinaus konnte auch mit DEA/NO eine signifikante Erhöhung der Konzentration von cGMP, um den Faktor $2,33 \pm 0,60$ ($2,16 \pm 0,19$ pmol/cGMP/mg protein) im Vergleich zur Kontrolle, in den Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3.9.2). Mit Isoproterenol konnte keine signifikante Veränderung des cGMP-Gehalt in den isolierten Kardiomyozyten induziert werden (Abb. 3.9.2).

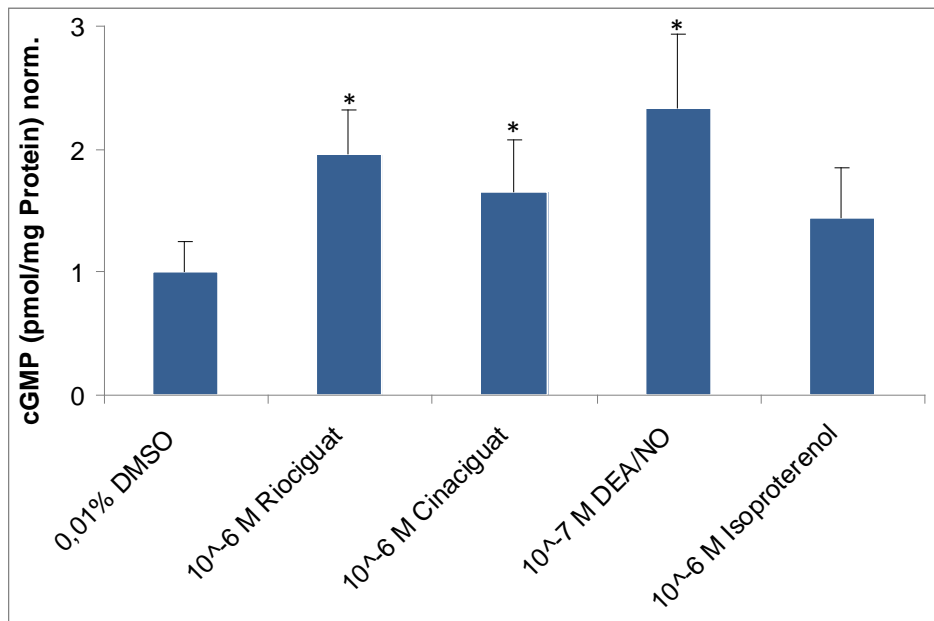


Abb. 3.9.2 Intrazelluläre cGMP-Konzentration nach Inkubation mit verschiedenen Prüfsubstanzen. Die Messung erfolgte mittels RIA nach 20 Minuten Inkubation mit der jeweiligen Prüfsubstanz. Die Daten sind bezogen auf den zellulären Proteingehalt und normalisiert gegen die jeweilige Kontrollinkubation mit 0,01% DMSO. *signifikanter Unterschied zur Kontrollinkubation (gepaarter t-Test, $p < 0,05$; $n = 3-4$)

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Fragestellung, welcher Effekt die Stimulatoren (BAY 41-2272, Riociguat) und Aktivatoren (BAY 60-2770, Cinaciguat) der löslichen Guanylatzyklase auf die Kontraktilität (Inotropie) und die Relaxation (Lusitropie) isolierter Kardiomyozyten haben. Diese Effekte wurden mit denen von klassischen NO-Donatoren (DEA/NO, SIN-1 Chlorid) sowie dem Einfluss eines β -adrenorezeptor Agonisten (Isoproterenol) sowie einem Ca^{2+} -Antagonisten (Verapamil) verglichen. Die Untersuchung der Inotropie erfolgte anhand der maximalen Zellverkürzung (bl peak h%) und der Kontraktionsgeschwindigkeit (dep v) und der Lusitropie anhand der Relaxationsgeschwindigkeit (ret v). Gleichzeitig wurde anhand des intrazellulären Calcium-Transienten der Einfluss auf den Calcium-Stoffwechsel untersucht. Zudem wurde für einige der analysierten Substanzen die Aktivierung der cGMP- und cAMP-Bildung mittels Radioimmunoassay in den Herzmuskelzellen gemessen.

4.1 Methodendiskussion

Um den Effekt pharmakologischer Substanzen auf die Inotropie und Lusitropie am Herzen zu erfassen, können unterschiedliche Messmethoden angewandt werden. Zum einen kann die Untersuchung *in-vitro* am isolierten Langendorff-Herz oder, wie in der vorliegenden Studie, an isolierten Kardiomyozyten erfolgen^{156,160,162,163}. Zum anderen können *in-vivo* Messungen präklinisch im Tiermodell oder klinisch am Mensch durchgeführt werden¹⁶⁴.

Das Arbeiten mit isolierten Kardiomyozyten ist seit Jahrzehnten etabliert und hat entscheidende Vorteile¹⁶⁵. Die computergesteuerte Messung von intrazellulärem Calcium durch Calcium-bindende Fluoreszenzfarbstoffe mit gleichzeitiger Überwachung der dynamischen Veränderungen in den Zellen ermöglicht in der vorliegenden Studie die Erfassung der kontraktile Parameter simultan mit den Calciumveränderungen in den isolierten Kardiomyozyten¹⁵⁶. Es wird bei den durchgeführten Versuchen evident, dass die Messung der Zellverkürzung die systolischen und diastolischen Eigenschaften von intakten Herzmuskelzellen widerspiegelt¹⁶².

Ein weiterer Vorteil ist, dass systemische und organbedingte Einflüsse ausgeschaltet bzw. kontrolliert werden können. Diese Einflüsse erschweren die Aussage, ob der gemessene inotrope oder lusitrope Effekt durch den Wirkstoff entstanden ist oder anderweitig zustande kommt. Zu diesen Einflussfaktoren gehören unter anderem Veränderungen der Vor- und Nachlast, neuroendokrine Substanzen im Blut und Veränderungen des Koronarflusses. Die Veränderung der Vor- und Nachlast, gerade bei starken Vasodilatoren, wie den Stimulatoren und Aktivatoren der löslichen Guanylatzyklase in unserer Studie, führen *in-vivo* zur Abnahme des MAP. Dadurch wird über die Barorezeptoren im Sinus der Karotiden der sympathische Input auf das Herz erhöht. Es kommt zur Reflertachykardie durch vermehrte Ausschüttung von Katecholaminen¹⁶⁶⁻¹⁶⁸. Diese Katecholamine haben einen direkten positiv inotropen und lusitropen Effekt auf das Herz^{48,49,169,170}. Zu- und Abnahme der Vorlast werden begleitet von einer gleichzeitigen Aktivierung der parakrinen Ausschüttung von NO durch die NO-Synthasen der Koronargefäße. Dies hat Einfluss auf die Kontraktilität und Relaxation der Kardiomyozyten. Die Zunahme der Vordehnung und die verstärkte Ausschüttung von NO resultiert in einem Anstieg der Dehnbarkeit und Beschleunigung der Relaxation¹⁷¹. Veränderungen der Koronardurchblutung durch Erhöhung des Blutflusses oder des Perfusionsdruckes als Folge der Vasodilatation führen zu einer verstärkten myokardialen kontraktile Kraft und Abnahme der Dehnbarkeit des Myokards¹⁷²⁻¹⁷⁷. Dafür ist hauptsächlich das Gregg-Phänomen, welches durch die verbesserte Sauerstoffversorgung des Myokards zu einer Zunahme der Kontraktilität führt, verantwortlich¹⁷³. Der Garden Hose Effekt induziert durch den erhöhten Perfusionsdruck die Dehnung der Gefäße und damit eine Zunahme der Myofilamentenlänge, welches zur Verbesserung der Nutzung des Frank-Starling Mechanismus führt. Zusätzlich werden dehnungsaktivierende Kanäle geöffnet, die zu vermehrten Einstrom von Calcium führen^{175,177}. Ebenfalls kann eine reduzierte Dehnbarkeit als Folge des erhöhten Perfusionsdruckes in den Koronargefäßen beobachtet werden¹⁷⁵.

Als Alternative sind auch Messungen am isolierten Langendorff-Herz möglich^{160,163}. In diesem Fall sind auch Effekte, unabhängig der erwähnten Einflussfaktoren, wie systemische Zirkulation und neurohumorale Faktoren im Blut, zu erwarten. Zusätzlich wird das Herz durch die Denervierung von vagalen und sympathischen Stimulationen getrennt. Der Koronarfluß kann durch Regulierung des Perfusionsdruckes oder

Blutflusses beeinflusst werden und somit der Effekt auf das Herz reduziert werden. Ein zusätzlicher Vorteil ist, dass durch diese Methode bei pharmakologischen Interventionen eine zufriedenstellende kontrollierte Dosis-Antwort Studie am Herzen durchgeführt werden kann ¹⁶³. Mit Hilfe dieser Methode können mehrere Parameter erfasst werden: HF, kontraktile Funktionen, linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP), die Druckerhöhungsgeschwindigkeit (dp/dt_{max}) und die Druckabfallgeschwindigkeit (dp/dt_{min}) sowie die ventrikuläre Dehnung und Erfassung der Frank-Starling Kurve ¹⁶⁰. Ein Nachteil gegenüber der Messung an isolierten Kardiomyozyten ist, dass die Veränderung des Calcium-Transienten nicht simultan erfasst werden kann. Mit dem Parameter dp/dt_{max} kann eine Aussage über den inotropen Effekt, mit dp/dt_{min} und mit LVEDP über den lusitropen Effekt am Herzen getroffen werden. Die Verwendung der Druckabfallgeschwindigkeit zur genauen Bestimmung der Lusitropie ist jedoch problematisch, da sie von der Inotropie abhängig ist. Die Länge und Rate der Kontraktion bestimmt, zu welchem Grad die Relaxation stattfinden muss, um in den Ausgangspunkt zurückzukehren ¹⁷⁸. LVEDP ist als Interpretation ebenfalls schwierig, da sowohl eine Veränderung der Geschwindigkeit der Relaxation, als auch die diastolische Dehnbarkeit diesen Wert beeinflussen ¹⁷⁹. *In-vivo* können auch mittels Herzkatheteruntersuchungen LVEDP, PCWP, dp/dt_{min} , dp/dt_{max} , die frühdiastolische Füllungsgeschwindigkeit (PFR), die Steifheitskonstante (b) als Maß der myokardialen Steifheit, das HZV sowie Relaxationsabfallskonstante (τ) gemessen werden^{180,181}. Alternativ steht die Echokardiographie zur Verfügung, in der im 2D-Bild und M-Mode die Kontraktilität anhand der EF, Verkürzungsfraction und regionalen Wandbewegungen bestimmt werden können ¹⁸². Doppler-Echokardiographisch sind indirekte Messungen der Diastologie anhand des Mitraleinstromprofils (E-, A-Welle, isovolumetrische Relaxationszeit, Dezelerationszeit) und der Mitralanulusgeschwindigkeit septal oder lateral möglich ¹⁸³. Diese Messungen können sowohl im Tiermodell als auch am Menschen durchgeführt werden. Dabei ist zu berücksichtigen, wie bereits oben erwähnt, dass zur Interpretation der Ergebnisse die äußeren Einflussfaktoren berücksichtigt werden müssen, die in den isolierten Versuchsmodellen ausgeschaltet werden. Ein weiterer Nachteil ist auch der invasive Eingriff einer Herzkatheteruntersuchung ¹⁸¹. Die Echokardiographie ergibt gerade bei der Bestimmung der Relaxation nur eine Schätzung und ist vor allem bei Herzrhythmusstörungen, wie z.B. bei Vorhofflimmern, nicht aussagekräftig¹⁸³. Zudem

ist auch bei diesen Versuchsmethoden keine gleichzeitige Messung des Calcium-Transienten möglich.

Zur Bestimmung der Lusitropie erfolgte in der vorliegenden Arbeit die Ermittlung der Relaxationsgeschwindigkeit. Dies ist ein wesentlicher Unterschied zu älteren Studien, in denen Parameter wie die Veränderung der Zelllänge, der time-to-peak Zeit, der Relaxationszeit bis 50% der Relaxation und der Calcium-Abfallgeschwindigkeit beobachtet wurden. Die Zelllänge ist ein Messwert für die Dehnbarkeit, die time-to-peak Zeit und Relaxationszeit für 50% der Relaxation stellen den Beginn der Relaxation dar ¹⁰⁴. Mit diesen Parametern kann nicht die gesamte Relaxationszeit erfasst werden. Die Relaxationsgeschwindigkeit, wie sie in unserer Arbeit bestimmt wurde, ist aussagekräftiger, da die komplette Relaxationszeit mit schneller und langsamer Relaxation berücksichtigt wird ¹⁶⁴.

Zur Validierung des Zellmodellbaus erfolgte in unserer Arbeit die Untersuchung des stark positiv inotropen und lusitropen Effektors Isoproterenol und des stark negativ inotropen Calcium-Antagonisten, Verapamil. In der vorliegenden Studie konnte eine ausgeprägte konzentrationsabhängige und dosisabhängige Zunahme der Kontraktion und Relaxation unter Isoproterenol mit einem cAMP-Anstieg im Radioimmunoassay beobachtet werden. Das Dosis-Wirkungsprofil war dabei älteren Arbeiten gleichwertig¹⁸⁴. In der Untersuchung mit Verapamil konnte im Vergleich zu vorherigen Arbeiten zwar ein negativ inotroper Effekt nachgewiesen werden, jedoch mit reduziertem Effekt ¹⁸⁵. Aufgrund der Übereinstimmung unserer Ergebnisse mit älteren Studie und der Korrelation auf zellulärer und biochemischer Ebene gehen wir von einem zuverlässigen „read-out“ Modell aus.

4.2 Positiv inotroper/lusitroper Effekt von Isoproterenol

Isoproterenol ist ein β -adrenerger Agonist, der auf die β_1 - und β_2 -Rezeptoren wirkt und zu einer Aktivierung des cAMP/Proteinkinase A (PKA) Signalwegs führt ¹⁸⁶. Sowohl in isolierten Kardiomyozyten wie auch am Herzen konnte bereits in mehreren Studien eine Zunahme der Kontraktilität und Relaxation beobachtet werden, mit simultaner Zunahme des Calcium-Transienten in den isolierten Herzmuskelzellen ¹⁸⁷⁻¹⁹⁰. Dies zeigte sich ebenfalls in der vorliegenden Studie an isolierten Rattenkardiomyozyten, anhand der dosisabhängigen, beschleunigten Kontraktions- (Abb. 3.1.2) und Relaxationsgeschwindigkeit (Abb. 3.1.3) sowie an der Zunahme der maximalen

Kontraktilität (Abb. 3.1.1) mit Erhöhung des Calcium-Transienten (Abb. 3.1.4). Mittels RIA konnte in dieser Arbeit eine signifikante Aktivierung von cAMP um den Faktor 22,4 \pm 4,74 im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden (Abb. 3.9.1).

Für die beschleunigte Relaxation durch Katecholaminen werden in mehreren Studien auf zellulärer Ebene zwei Mechanismen verantwortlich gemacht: (1) die Phosphorylierung von PLB und (2) die Phosphorylierung von TnI durch die PKA^{48,51,169,191-193}. Die Phosphorylierung von PLB führt zur Aufhebung des inhibitorischen Effektes der SERCA mit daraus resultierender Verstärkung der Relaxation^{47,189,193-195}. Die Phosphorylierung von TnI, welches mit TnC interagiert, vermindert die Sensibilität des Myofilaments auf das Calcium. Dadurch kommt es zu einer schnelleren Lösung vom Myofilament und zum positiv lusitropen Effekt^{48,51,169,196}. Die Wirkung auf PLB spielt dabei vermutlich die größere Rolle⁴⁸.

Der positiv inotrope Effekt der Katecholamine entsteht auf der Basis der Phosphorylierung von L-Type Calcium Kanäle, PLB und Ryanodin Rezeptoren (RyR). Über die L-Type Calcium Kanäle kommt es während der Kontraktion zu einer Zunahme des Calcium-Transienten mit verstärkter Kontraktilität^{192,197-199}. PLB führt zur verstärkten Aufnahme von Calcium ins SR und folglich zu einer verstärkten Calcium-Ladung. Es kommt zu einer erhöhten Calcium-Abgabe während der Systole¹⁹².

Die Aktivierung von RyR führt zu einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit des Rezeptors. Aufgrund des erhöhten Calciumausstroms aus dem SR kommt es zu einer Erhöhung des inotropen Effektes^{192,200}.

4.3 Negativ inotroper/lusitroper Effekt von Verapamil

Verapamil ist ein Beispiel für einen negativ inotropen Wirkstoff. Bei Verapamil handelt es sich um einen Hemmer des L-Typ Calcium Kanals^{201,202}. Dieser resultiert in einer Abnahme des Calcium Einstroms in die Zelle über den L-Typ Calcium Kanal, was wiederum zu einer geringeren Calcium-abhängigen Aktivierung der RyR führt und damit zusätzlich eine abnehmende Ausschüttung von Calcium aus dem SR mit sich bringt²⁰²⁻²⁰⁵. Diese beiden Mechanismen sind für den negativ inotropen Effekt verantwortlich. Dieser Effekt konnte auch in der vorliegenden Studie, anhand der signifikanten dosisabhängigen Abnahme der Kontraktion (Abb. 3.2.1) mit gleichzeitiger

Abnahme des Calcium-Transienten (Abb. 3.2.4) und der Abnahme der Kontraktionsgeschwindigkeit (Abb. 3.2.2) gezeigt werden.

Darüber hinaus hemmt Verapamil den Ausstrom von Calcium aus den Herzmuskelzellen mit Prolongation der Relaxation und wirkt somit zusätzlich negativ lusitrop²⁰⁴. Diese Arbeit konnte ebenfalls zeigen, dass Verapamil nach Gabe auf die isolierten Kardiomyozyten eine transiente Reduktion der Relaxationsgeschwindigkeit nach 2 Minuten in der mittleren Konzentration 10^{-7} M bewirkte (Abb. 3.2.3).

4.4 Inotroper und lusitroper Effekt von NO-Donatoren

Die Stimulatoren und Aktivatoren der löslichen Guanylatzyklase haben ähnliche Effekte wie NO-Donatoren und Nitrate^{123,144,206}. Beide Wirkstoffgruppen führen zur Aktivierung der sGC und zur intrazellulären Bildung von cGMP^{76,133,144,146}. Im Gegensatz zu spezifischen sGC-Aktivatoren und -Stimulatoren können NO-Donatoren zusätzlich cGMP-unabhängige Wirkungen unter Umgehung der sGC-Kaskade entfalten²⁰⁷. Um die Veränderung der Kontraktilität und Relaxation durch NO-Donatoren zu beurteilen, wurden im Rahmen dieser Studie zwei Vertreter dieser Stoffgruppe, DEA/NO und SIN-1 Chlorid, untersucht.

DEA/NO gehört zur Gruppe der NONOate, welche in wässrigen Medien spontan zur Freisetzung von 2 Molekülen NO führen^{207 208}. SIN-1 Chlorid bildet sowohl NO wie auch Superoxid, welches dann zu Peroxynitrit umgewandelt wird²⁰⁹. Somit kann SIN-1 Chlorid sowohl über NO als auch durch Nitrosylierungen diverser Ionenkanäle durch Peroxynitrit wirken²¹⁰.

Mit Hilfe von NO-Donatoren wurde bereits in den 90er Jahren die Wirkung von exogenem NO an isolierten Kardiomyozyten, Papillarmuskeln und ganzen Herzen untersucht. Die bisherigen Studien zeigten widersprüchliche Ergebnisse in Bezug auf den inotropen Effekt von NO-Donatoren^{99,104,211-214}.

In mehreren Studien wurde nach Gabe von NO-Donatoren ein bimodaler Effekt mit einem leicht positiv inotropen Effekt in geringer und einem negativ inotropen Effekt in hohen Konzentrationen nachgewiesen^{99,211,212}. In anderen Studien konnte bei hohen Konzentrationen wiederum ein positiv inotroper Effekt detektiert werden²¹⁴. Dafür sind sowohl cGMP-abhängige wie auch cGMP-unabhängige Mechanismen verantwortlich.

In isolierten Kardiomyozyten von Wistar-Ratten konnte nach Gabe von 100µmol/l Glycerintrinitrat (GTN), 1µmol/l SNAP und 1µmol/l DEA/NO ein positiv inotroper Effekt beobachtet werden. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich an isolierten Papillarmuskeln von Katzen nach Gabe von 0,01-10µmol/l SNAP^{99,212}. Dabei konnte nur eine leichte Erhöhung von cGMP gemessen werden, während cAMP und Calcium im Vergleich dazu stark erhöht waren²¹². Der positiv inotrope Effekt konnte durch die Gabe eines cAMP-Antagonisten, Rp-8-CPT-cAMP, gehemmt werden, jedoch nicht durch die Gabe von ODQ, einem Inhibitor der sGC oder KT 5823, einem Inhibitor der PKG²¹². Als mögliche Ursachen dafür wurde eine cGMP-abhängige Wechselwirkung mit der cAMP/AC Kaskade durch Hemmung der Phosphodiesterase III (PDEIII) postuliert, welche die Hydrolyse und somit den Abbau von cAMP hemmt^{99,212}.

In späteren Studien konnte die Annahme eines cGMP-abhängigen positiv inotropen Effektes von NO-Donatoren weiter widerlegt werden. Vila-Petroff et al. 1999 zeigten an isolierten Kardiomyozyten von Sprague-Darwley Ratten nach Gabe von 1µmol/l SNAP eine Zunahme der Kontraktilität mit moderaten, aber signifikanten Anstieg von intrazellulären cGMP und starken Anstieg von cAMP, begleitet von einem Anstieg der Calcium-Amplitude²¹¹. Unter Gabe von ODQ wurde der cGMP Anstieg unter SNAP 1µmol/l gehemmt, jedoch nicht der cAMP-Anstieg und der positiv inotrope Effekt. Eine cGMP-unabhängige Wirkung konnten auch Paolucci et al. 2000 aufzeigen, die eine signifikante Zunahme der Kontraktilität an isolierten Herzen von Wistar Ratten mit 10⁻⁵M SIN-1 Chlorid und 10⁻⁷M DEA/NO ohne signifikantem Anstieg von cGMP beobachten konnten²¹⁰. Auch Sarkar et al 2000 zeigten an isolierten humanen Kardiomyozyten und Kardiomyozyten von Meerschweinchen eine starke Zunahme der Kontraktilität nach Gabe von DEA/NO und S-Nitrosoglutathione (10⁻⁵M), sowohl mit als auch ohne β-adrenerger Stimulation. Dieser Effekt konnte durch die Gabe von 8-Br-cGMP, einem cGMP-Analogon (3x10⁻⁶M, 10⁻⁴M), nicht induziert werden²¹⁴. Der mögliche Mechanismus dafür ist eine cGMP-unabhängige S-Nitrosylierung von RyR durch NO und weniger erzeugt durch eine Kreuzreaktion mit cAMP und der PKA-Kaskade²¹⁵.

Der unter Gabe von NO-Donatoren induzierte negativ inotrope Effekt wurde in mehreren Studien eher bei hohen Konzentrationen beobachtet. Vila-Petroff und Layland et al. 2002 zeigten an isolierten Kardiomyozyten von Sprague-Darwley- bzw. Wistar-

Ratten einen kardiodepressiven Effekt nach Gabe von SNAP (100 μ mol/l) und DEA/NO (100nM bis 100 μ M) ^{104,211}. Dabei zeigte sich ein starker Anstieg des intrazellulären cGMP-Spiegels ohne Veränderung des Calcium-Transienten ^{104,211}. In früheren Studien wurde sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* der Effekt am ehesten auf einen cGMP/PKG-abhängigen, Calcium-unabhängigen Mechanismus zurückgeführt. In allen Studien wurde der negativ inotrope Effekt von einem hohen cGMP-Spiegel nach Gabe hoher Konzentrationen von NO-Donatoren beobachtet ^{99,211,212,216}. Eine Veränderung der Calcium-Amplitude zeigte sich dabei nicht ^{104,211,217,218}. Unterstützt wird diese Annahme durch die Reversibilität des negativ inotropen Effektes durch die Gabe von ODQ oder KT 5823, sowie der Imitation des Effektes durch Gabe von 8-Bromo-cGMP, einem Agonist von cGMP ^{99,106,212,215,216,219}. Als Grund für den negativ inotropen Effekt vermutet man zum einen die Hemmung der L-Typ Calcium Kanäle durch PKG-abhängige Phosphorylierung des Kanals und zum anderen eine Abnahme der Sensibilität der Myofilamente auf Calcium durch cGMP/PKG-abhängige Phosphorylierung von TnI ^{104,106,211,220-222}. Zhang et al. machten in zwei Studien (2005 und 2007) die cGMP-PKG abhängige Phosphorylierung von PLB zusätzlich für den negativ inotropen Effekt verantwortlich ^{223,224}.

In der Studie von Layland 2002 konnte in niedrigen Konzentrationen von DEA/NO (10⁻⁹mol/l-10⁻⁸mol/l) im Vergleich zu älteren Studien keine signifikante Veränderung der Kontraktilität nachgewiesen werden ^{104,211}. Vergleichbar mit den Ergebnissen dieser Studie konnten in dieser Arbeit für beide getesteten NO-Donatoren in vergleichbaren Konzentrationen (DEA/NO: 10⁻⁹mol/l-10⁻⁷ mol/l; SIN-1 Chlorid: 10⁻⁹mol/l-10⁻⁶mol/l) keine signifikante Veränderung der Inotropie beobachtet werden (Abb. 3.3.1, Abb. 3.3.2 und Abb.3.4.1 und 3.4.2). Lediglich in der maximalen Konzentration von DEA/NO (10⁻⁶mol/l) zeigte sich unabhängig von intrazellulären Calciumveränderungen, was vergleichbar mit früheren Studien ist, eine transiente Abnahme der Kontraktilität (Abb. 3.3.2 und Abb. 3.3.4). In submaximaler Konzentrationen für DEA/NO 10⁻⁷ mol/l konnte im Vergleich zur Kontrollinkubation zusätzlich ein signifikanter Anstieg des intrazellulären cGMP um den Faktor 2,33 \pm 0,60 nachgewiesen werden (Abb. 3.9.2). Dieser Effekt war vergleichbar mit einer früheren Studie in der mit 10⁻⁶M DEA/NO ein cGMP-Anstieg um den Faktor 1,5 zur Baseline nachgewiesen werden konnte ²¹². Im Gegensatz zur intrazellulären cGMP-Konzentration konnte in der vorliegenden Konzentration keine Zunahme des cAMP-Spiegels beobachtet werden (Abb. 3.9.1).

Anders als in vorherigen Studien beschrieben, ist eine Kreuzreaktion mit der cAMP-PKA-Kaskade über die Wirkung von cGMP auf die Phosphodiesterase in der vorliegenden Studie mit DEA/NO eher unwahrscheinlich^{68,69}. Zusammenfassend ist davon auszugehen, dass eine Zunahme des cGMP-Spiegels durch die Interaktion mit sGC zurückzuführen ist.

Neben inotropen Effekten sind für NO-Donatoren auch lusitrope Effekte beschrieben^{100,104,210}. Paolucci et al. 2000 und Layland et al. 2002 zeigten eine Zunahme der Lusitropie unter Gabe von DEA/NO und SIN-1 Chlorid an isolierten Kardiomyozyten von Wistar-Ratten auf^{104,210}. DEA/NO (10µmol/l) und 8-Bromo-cGMP (50µmol/l) zeigten eine verkürzte Kontraktionszeit mit früherem Beginn der Relaxation, sowie eine Verlängerung der diastolischen Zelllänge. Die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit blieben dabei unverändert^{96,104}. Eine Zunahme der intrazellulären cGMP-Konzentration und Calcium-Amplitude konnten jedoch in der Studie von Paolucci et al. 2000 nicht beobachtet werden²¹⁰. Die Abnahme der Calcium-Affinität wurde für die beschleunigte Relaxation und somit den positiv lusitropen Effekt der Kardiomyozyten durch NO-Donatoren verantwortlich gemacht¹⁰⁴. Durch die Zugabe von Inhibitoren der sGC und der PKG konnte die Abnahme der Calcium-Affinität durch DEA/NO gehemmt werden¹⁰⁴. Ein weiterer Mechanismus für die zunehmende Lusitropie konnte in zwei Studien auf eine cGMP-abhängige Aktivierung der SERCA zurückgeführt werden. Dies würde dazu führen, dass Calcium schneller ins SR aufgenommen wird und dadurch die Relaxation beschleunigt wird^{225,226}.

Vergleichbar mit den Ergebnissen von Shah et al. 1994 und Layland et al. 2002, die nach Gabe von 8-Bromo-cGMP und DEA/NO keine signifikante Veränderung der Relaxationsgeschwindigkeit in isolierten Kardiomyozyten nachweisen konnten, zeigte sich im Konzentrationsbereich zwischen 10^{-9} mol/l und 10^{-6} mol/l mit DEA/NO und SIN-1 Chlorid das gleiche Bild (Abb. 3.3.3, 3.4.3)^{96,104}. Deshalb wird in der vorliegenden Studie davon ausgegangen, dass die untersuchten NO-Donatoren keinen positiv lusitropen Effekt besitzen. Im Gegensatz dazu, führten Shah et al. und Layland et al. in ihrer Studie jedoch die verkürzte Kontraktionszeit mit dem früheren Beginn der Relaxation sowie der Verlängerung der diastolischen Zelllänge auf eine lusitrope Wirkung zurück^{96,104}.

Die widersprüchlichen Ergebnisse für NO-Donatoren in Bezug auf Inotropie und Lusitropie und die damit verbundene schwere Vergleichbarkeit sind möglicherweise auf die Anwendung unterschiedlicher Messmethoden in den verschiedenen Studien zurückzuführen, wie z.B. Patch-Clamp Messungen für die Calciumdetektion vs. Fluoreszenzmarkierung von Calciumionen sowie der Detektion via einem Video-Edge-System. Zusätzlich spielt aber sicherlich auch die Verwendung unterschiedlicher Tierspezies (Maus, Ratte, Katze, Hund) und Untersuchungsmaterialien eine Rolle, z.B. ob die Kontraktilität am ganzen Herzen, am Papillarmuskel, am isolierten adulten Kardiomyozyten oder an isolierten neonatalen Kardiomyozyten bestimmt wird.

4.5 Inotrope und lusitrope Effekte von Riociguat und Cinaciguat

Die Kontraktilitätsparameter der sGC-Stimulatoren und -Aktivatoren zeigen in der vorliegenden Studie ein ähnliches Bild wie bei den NO-Donatoren.

Bei BAY 41-2272, der Vorläufersubstanz des sGC-Stimulatoren Riociguat, konnte zwar in den hohen Konzentrationen 10^{-6}M und 10^{-5}M eine signifikante Zunahme der Kontraktilität, der Kontraktionsgeschwindigkeit und der Relaxationsgeschwindigkeit beobachtet werden (Abb. 3.5.1-3.5.3). Die Zunahme der Kontraktilität unter BAY 41-2272 ist aufgrund des stärkeren Effektes auf die Relaxationsgeschwindigkeit am ehesten auf die lusitrope Wirkung zurückzuführen. Die eigentliche Prüfsubstanz Riociguat hatte dagegen keinen Einfluss auf das Kontraktionsverhalten von Kardiomyozyten, auch nicht in der maximalen Konzentration von 10^{-5}M (Abb. 3.6.1-3.6.3). Bei den sGC-Aktivatoren zeigten, weder die Vorläufersubstanz BAY 60-2770 (Abb. 3.7.1-3.7.3) noch die eigentliche Prüfsubstanz Cinaciguat (Abb. 3.8.1-3.8.3), in den gemessenen Konzentrationen und Parametern einen Effekt auf die Kardiomyozyten.

Jedoch konnten wir bereits bei einer submaximalen Konzentration von 10^{-6}M von Riociguat und Cinaciguat eine signifikante Erhöhung des intrazellulären cGMP-Spiegels im Vergleich zur Kontrollinkubation um den Faktor $1,97\pm 0,36$ bzw. $1,66\pm 0,43$ im Radioimmunoassay nachweisen (Abb. 3.9.2).

Dies deutet darauf hin, dass durch beide Substanzen cGMP/PKG-abhängige Effekte induziert werden. Die Zielstrukturen von cGMP/PKG sind L-Typ Calcium-Kanäle, Ryanodin Rezeptoren und SERCA. Die cGMP-abhängige Hemmung der L-Typ Calcium-Kanäle führt zu einer Abnahme des Calcium-Transienten mit nachfolgender

Abnahme der Kontraktilität^{107,220,227,228}. Die Aktivierung der RyR führt dagegen zu einer Zunahme des Calcium-Transients und daraus resultierend zur Zunahme der Kontraktilität^{229,230}. Des Weiteren katalysiert die PKG die Phosphorylierung von TnC, was eine Abnahme der Sensibilität der Myofilamente für Calcium zur Folge hat, so dass die Ablösung vom Myofilament vereinfacht ist und somit eine beschleunigte Relaxation induziert wird. Zusätzlich führt die Aktivierung von Phosphodiesterase III durch die PKG zu einem vermehrten Abbau von cAMP und auf diese Weise ebenfalls zur Abnahme der Kontraktilität^{104,211}. cGMP reguliert zusätzlich die Relaxation und Dehnbarkeit isolierter Kardiomyozyten, indem es zur Phosphorylierung von PLB und zur Abnahme der Calcium-Affinität der Myofilamente durch Phosphorylierung des TnI führt^{91,96,104,223,224,226}.

Die Anzahl der Studien zur Klärung des inotropen und lusitropen Effektes von Stimulatoren und Aktivatoren der sGC an isolierten Herzen oder Herzmuskelzellen sind limitiert. Eine Studie zur direkten Wirkung beider Prüfsubstanzen an isolierten Kardiomyozyten erfolgte bisher nicht.

Boerrigter et al. 2003 beschrieb die Zunahme des HZV und Abnahme des PCWP nach Gabe von BAY 41-2272 bei Hunden mit induzierter Herzinsuffizienz¹²³. Die Ursache für dieses Phänomen wurde auf eine Abnahme der Nachlast oder eines lusitropen Effektes zurückgeführt¹²³. Eine Abnahme des PCWP sowie die Zunahme des HZV konnte auch in verschiedenen klinischen Studien an gesunden männlichen Probanden und an Patienten mit ADHF nach intravenöser Gabe von Cinaciguat beobachtet werden^{148,149,231,232}. Boerrigter und Kollegen stellten bereits 2003 die Hypothese auf, dass die Zunahme des HZV ein Hinweis auf einen direkten positiv inotropen Effekt ist, während die Abnahme des PCWP auf einen direkten positiv lusitropen Effekt zurückzuführen sei¹²³.

Im Widerspruch zu der Hypothese von Boerrigter stehen mehrere *in-vitro* und *in-vivo* Studien, sowie die vorliegende Arbeit an isolierten Herzmuskelzellen^{146,149,233-235}. Stasch et al. 2002 zeigte *in-vitro* am Langendorff-Herz-Modell mit BAY 41-8543 eine signifikante Abnahme des Koronarflussdruckes mit maximaler Abnahme um bis zu 70% in der höchsten Konzentration (1µg/ml). Jedoch konnte kein Effekt auf den linksventrikulären Druck, als Maß der inotropen Wirkung und der Herzfrequenz, gemessen werden²³³. In einem weiteren Versuchsmodell mit gesunden anästhesierten

Hunden mit Sympathikusblockade konnte nach Bolusgabe von 3 bis 100µg/kg BAY 41-8543 keine Veränderung der dp/dt_{max} und LVEDP mittels Herzkatheter gemessen werden²³⁴. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen hinsichtlich der inotropen und lusitropen Effekten der sGC-Stimulatoren, die in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurden. Es konnten keine Veränderungen der maximalen Zellverkürzung, sowie der Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit gemessen werden (Abb. 3.6.1-3.6.3, 3.7.1-3.7.3, 3.8.1-3.8.3). Die frühere *in-vivo* Studie wurde dabei mit BAY 41-8543 durchgeführt, ein 3-fach potenterer NO-unabhängiger und häm-abhängiger sGC-Stimulator als das von uns verwendete BAY 41-2272¹²².

Auch in einem Herzinsuffizienz-Modell mit Hunden konnte nach Gabe von Cinaciguat zwar eine Zunahme des HZV nachgewiesen werden. Die linksventrikuläre externe Arbeit blieb dabei unverändert. Dies ist ein weiterer Hinweis, dass Cinaciguat keine direkte inotrope Wirkung ausübt¹⁴⁶. Die Beobachtungen aus *in-vivo* Studien decken sich somit mit den Daten bezüglich inotropen und lusitropen Effekten, die in der vorliegenden *in-vitro* Studie generiert wurden.

Die fehlende inotrope und lusitrope Antworten in der vorliegenden Studie könnten auch ein Hinweis auf eine zu geringe Zunahme der cGMP Konzentration in den Kardiomyozyten sein. Riociguat und Cinaciguat ($10^{-6}M$) führen zu einem Anstieg des cGMP-Spiegels um den Faktor 1,97±0,36 bzw. 1,66±0,43 (Abb. 3.9.2). In Bezug auf die Kontraktilität konnte für beide Wirkstoffe ein gleiches Ergebnis gefunden werden. Mit gleichen Größenordnungen wurde bereits in früheren Untersuchungen eine Steigerung der cGMP Produktion mit Riociguat und Cinaciguat beobachtet. Für Riociguat konnte *in-vivo* im Plasma von jungen männlichen Probanden eine um das 1,7 bzw. 2,0fache Konzentration nach oraler Gabe von 2,5mg bzw. 5,0mg Riociguat nachgewiesen werden^{135,148}. In den glatten Muskelzellen der Pulmonalarterien zeigte sich eine Zunahme des cGMP Spiegels um das 6,5fache mit 10µM ($10^{-5}M$) Cinaciguat²³⁶. Im Gegensatz dazu konnte in isolierten Mäuseherzen im Endotoxin Schock Modell kein signifikanter cGMP Anstieg nach Gabe von BAY 41-2772 und Cinaciguat beobachtet werden²³⁷.

Für die sGC-Stimulatoren wird mit NO ein synergistischer und für die sGC-Aktivatoren ein additiver Effekt auf die sGC beschrieben^{116-118,144,145,206}.

Obwohl der sGC-Stimulator BAY 41-2772 alleine nicht so stark wirksam ist wie NO, sind Konzentrationen von 10-100nM ausreichend, um über die Aktivierung der sGC eine Zunahme des cGMP im physiologischen Bereich zu induzieren ¹¹⁶. Dieser Effekt verstärkt sich nach Zugabe von NO-Donatoren. BAY 41-2272 erreicht *in-vitro* bei Zugabe von 1µM DEA/NO und 100µM BAY 41-2272 eine 416-fache Zunahme der speziellen Aktivität von sGC im Vergleich zur Baseline ¹¹⁶. Riociguat stimuliert die sGC Aktivität bei Konzentrationen von 0,1 bis 100µM auf das 2- bis 73-fache. Auch hier entsteht bei der zusätzlichen Gabe von DEA/NO (0,1µM) zu Riociguat (100µM) ein synergistischer Effekt mit Zunahme der Aktivität auf das 112fache ¹³³. Die Aktivatoren weisen ebenfalls, im Vergleich zu NO alleine, nur einen geringeren Effekt auf die cGMP Produktion auf. Bei Cinaciguat wird *in-vitro* ab einer Konzentration von 1nM eine Erhöhung von cGMP im physiologischen Bereich erwartet. Cinaciguat stimuliert konzentrationsabhängig die spezifische Aktivität von sGC in den Konzentration 0,001-10µM auf das 2 bis 37-fache im Bezug zur Baseline. Auch hier kommt es bei Zugabe von DEA/NO (10 und 100nM) zu einer Erhöhung des Effektes. Bei zusätzlicher Gabe von ODQ (10µM) beobachteten Stasch et al. eine höhere Zunahme der spezifischen Aktivität von sGC auf das 187-fache im Bezug zur Baseline ¹⁴⁴. Die Stimulation der sGC durch Riociguat wird durch ODQ jedoch nahezu vollständig geblockt. ODQ führt zur Inhibition der sGC durch Oxidation der Häm-Gruppe, was den Effekt bei oxidativem Stress auf Zellen imitiert ^{71,74,238,239}.

Die verschlechterte Wirksamkeit auf die sGC-Aktivität im Vergleich zu NO-Donatoren zeigt sich auch *in-vivo* an anästhesierten Hunden unter autonomer Blockade. Um den gleichen Effekt einer Reduktion des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) von -39 bzw. -31% mit Cinaciguat und GTN zu erreichen, ist eine höhere Boluszugabe von Cinaciguat von 30µg/kg KG im Vergleich zu GTN (3µg/kg KG) nötig ¹⁴⁴. Die Stimulatoren und Aktivatoren der sGC führen zwar *in-vitro* und *in-vivo* zu einer reduzierten Aktivierung von sGC, jedoch ist der vasodilatierende Effekt auf Gefäße im Vergleich zu Nitraten stärker ausgeprägt ^{144,233}.

BAY 41-8543 zeigt an isolierten, mit Epinephrin präkonstriktorischen Arteria Saphena (Kaninchen), Aorta (Kaninchen), Koronararterien (Schwein) und Femoralvenen (Hund) einen stärkeren vasorelaxierenden Effekt als SNP, SIN-1 Chlorid und GTN ²³³. Betrachtet man Cinaciguat an isolierten Arteriae saphena, zeigt es im Vergleich zu BAY 41-2272 einen 160fach höheren vasorelaxierenden Effekt. Zusätzlich ist die

konzentrationsabhängige Abnahme des Perfusionsdruckes der Koronargefäße ohne Veränderung des linksventrikulären Druckes und der Herzfrequenz im Langendorff-Herz durch Gabe von Cinaciguat doppelt so stark ausgeprägt als durch GTN ¹⁴⁴.

Boerrigter et al. 2007 postulierte, dass die Abnahme des PCWP und die Zunahme des HZV eher auf die Reduktion der Vor- und Nachlast zurückzuführen ist ¹⁴⁶.

Hinweise für die nachlastsenkende Wirkung von beiden Wirkstoffen zeigten Stasch et al. 2006 anhand eines Modells mit spontan hypertensiven Ratten nach oraler Gabe von BAY 41-2272 (1-10 μ g/kg KG) und Cinaciguat (3mg/kg KG bzw. 10mg/kg KG), sowie durch Untersuchungen an anästhesierten Ratten nach intravenöser Gabe von Cinaciguat (10 μ g/kg KG). Es stellte sich ein lang anhaltender Abfall des Blutdrucks durch die Gabe von BAY 41-2272 von 25 Stunden und für Cinaciguat von 12 Stunden ein ^{76,116}. Die antihypertensive Reaktion auf die Gabe von Cinaciguat wurde durch die vorherige Behandlung mit ODQ verstärkt. Der Blutdruckabfall nahm von 29mmHg auf 71mmHg zu und die Wirkzeit verlängerte sich auf bis zu 20 Stunden ⁷⁶. BAY 41-2272 ist ein starker arterieller Vasodilatator. Er führt *in-vitro* zur Vasodilatation von präkonstriktorisches Gefäßen der Aorta, Arteria mesenterica und Basilararterien ^{116,124,126,240}. Auch die Gabe von Cinaciguat verspricht eine vielversprechende Wirkung auf die Hemmung präkonstriktorisches Gefäße *in-vitro*. Es zeigt zusätzlich einen vasodilatierenden Effekt auf isolierte Arterienringe von nitratintoleranten Kaninchen ^{116,128}. Die vasodilatierende Eigenschaft ist verstärkt in Gefäßen mit oxidativem Stress, vorzufinden an Gefäßen von spontan hypertensiven Ratten, ApoE Knock-Out Mäusen mit hochfettiger Diät, Watanabe Kaninchen mit vererbter Hyperlipidämie und Diabetes Mellitus Patienten nachgewiesen werden konnte ⁷⁶. In einer plazebokontrollierten Studie mit anästhesierten Hunden zeigte sich nach Gabe von Cinaciguat (45 μ g/kg/h) eine Zunahme von dp/dt_{max} um bis zu 21%. Dieser inotrope Effekt kann vermutlich auf die starke Vasodilatation zurückgeführt werden, mit Reduktion der totalen peripheren Resistenz um bis zu 48% gegenüber der Baseline. Andererseits kann auch durch die reaktive Aktivierung des Sympathikus bei erhöhter Herzfrequenz bis 113% der inotrope Effekt beeinflusst werden ²³⁵. Ähnliche Beobachtungen konnten nach intravenöser Gabe von Cinaciguat bei humanen Probanden nach vorheriger Dosisfindung in einer 6-stündigen Infusion von 50, 200 und 400 μ g/h mit Abnahme des PCWP (-7,9mmHg) und Zunahme des HZV (+1,68L/min) gemacht werden. Mittels Swan Ganz-Katheter konnte eine Abnahme von RAP (-

2,9mmHg), PVR (-43,3dyn s/cm⁻⁵) und SVR (-596,6dyn s/cm⁻⁵) dabei gemessen werden. Im Plasma wurden als mögliche Folge der Vasodilatation signifikant erhöhte Noradrenalin Werte gemessen. Die Abnahme des PCWP ist somit in diesem Fall eher als eine Folge der venösen Vasodilatation als des direkten lusitropen Effektes von Cinaciguat zu werten, da auch RAP reduziert war. Der positiv inotrope Effekt beruht vermutlich auf der Abnahme der Nachlast gemessen an der Abnahme des SVR und weniger auf der direkten inotropen Wirkung der Prüfsubstanz ¹⁴⁹.

Auch für Riociguat wurde durch die orale Gabe des Stimulators in einer Phase III Studie (n=261, n=443) eine Abnahme des PVR und SVR gemessen, wie bereits in vorangegangenen klinischen Studien an gesunden männlichen Probanden und Patienten mit CTEPH und PH ^{135-139,142}. In den multizentrischen, randomisierten, doppelblinden, plazebokontrollierten CHEST-1 und PATENT-1 Studien konnte eine Abnahme der SVR um 226 dyn s/cm⁻⁵ bzw. 223dyn s/cm⁻⁵ gezeigt werden begleitet von einer deutlichen Verbesserung der hämodynamischen Parameter wie der Reduktion des mPAP (-4mmHg bzw. -4mmHg) und Zunahme des HZV (0,8L/min bzw. 1L/min) ^{138,139}. Aufgrund der Titrierung der Dosis in Abhängigkeit des systolischen Blutdrucks wurden keine Veränderungen in Bezug auf den systolischen und diastolischen Blutdruck beobachtet. In der DILATE-1 Studie (doppelblind, plazebokontrollierte Phase II) konnte bei 46 Patienten mit Pulmonaler Hypertonie und Diastolischer Herzinsuffizienz ebenfalls eine Zunahme des SV bei signifikanter Abnahme des SVR und des Blutdruckes unter der Therapie mit dem oralen Riociguat (2mg) beobachtet werden. Der positive inotrope Effekt ist auch hier eher als Folge der nachlastsenkenden Wirkung zurückzuführen und weniger einer direkten Wirkung des Stimulators. Ein direkter positiver lusitroper Effekt konnte in dieser Studie aufgrund der Zunahme des enddiastolischen rechtsatrialen Diameters postuliert werden, jedoch konnte kein Einfluss auf LVEDP und LVEDV, als Mass einer verbesserten Relaxation, gezeigt werden ¹⁴².

In Zusammenschau bisheriger Studien konnte bisher *in-vitro* an isolierten Herzen und *in-vivo* in verschiedenen Tiermodellen und an Probanden, was im Einklang mit den Beobachtungen in dieser Studie durch Gabe der sGC-Stimulatoren und –Aktivatoren, keine direkte Wirkung auf die Inotropie oder Lusitropie des Myokards nachgewiesen werden.

Dies unterstützt die Hypothese, dass als Folge des starken vasodilatierenden Effektes im pulmonalen und systemischen Blutkreislauf die Zunahme des HZV und Abnahme des PCWP, *in-vivo* bedingt sind durch die Senkung der Vor- und Nachlast ^{116,123,135-137,144,146,149,231,232,235}.

Die Senkung der Vor- und Nachlast wird zur Therapie der ADHF genutzt. In diesem Zusammenhang wurden Riociguat und Cinaciguat bereits in klinischen Studien untersucht ^{141,149}. Eine randomisierte, plazebokontrollierte Phase IIb Studie mit Cinaciguat musste hier trotz der guten vor- und nachlastsenkenden Wirkung aufgrund der starken hypotensiven Wirkung und der fehlenden Wirksamkeit auf die Dyspnoe und den Herzindex frühzeitig abgebrochen werden ^{150,151}.

Riociguat und Cinaciguat weisen im Gegensatz zu NO-Donatoren und Nitraten keine Toleranzentwicklung und Zytotoxizität, durch die Bildung von Peroxynitrit bei chronischer Gabe, auf ¹²⁸. Aufgrund der zusätzlichen nephroprotektiven, anti-schämischen und -remodellierenden Eigenschaften könnten beide Substanzen auch eine Therapieoption bei chronischer Herzinsuffizienz darstellen, vergleichbar mit der Gabe von ACE-Hemmern und β -Blockern ^{134,147,241,242}.

Einen weiteren Vorteil stellt das neutrale inotrope Verhalten von Cinaciguat und Riociguat dar, dass wir in unserer Studie nachweisen konnten. Im Gegensatz zu NO-Donatoren kommt es unter Gabe von Stimulatoren und Aktivator der sGC in hohen Konzentrationen nicht zu einer Abnahme der Kontraktilität ^{98,104,211}. Ein negativ inotroper Effekt würde zu einer Verschlechterung der Herzinsuffizienz führen, wie es auch durch die Aktivierung der iNOS beobachtet werden konnte ²⁴³⁻²⁴⁶.

Um einen klinisch-medizinischen Nutzen hinsichtlich der Anwendung von sGC-Stimulatoren und -Aktivatoren bei chronischer Herzinsuffizienz oder weiteren kardiovaskulären Erkrankungen zu klären, müssen weitere Untersuchungen folgen.

4.6 Limitationen der Studie

Die Übertragung von Ergebnissen aus Tierversuchen auf den Menschen ist allgemein mit Vorsicht zu betrachten. Dies gilt auch für die Erkenntnisse, die aus der vorliegenden Studie an Kardiomyozyten von Wistar Ratten gewonnen wurden, da Ratten im Vergleich zum Menschen nur wenige NCX exprimieren. Die Relaxation der Herzmuskelzellen wird bei Ratten hauptsächlich durch die SERCA-Pumpe reguliert ^{44,164}. Beim Menschen trägt jedoch der NCX ca. 25% zur Relaxation bei ^{164,192}. Gerade

bei der Herzinsuffizienz wird eine Zunahme der NCX auf Kosten der SERCA beobachtet^{54,247–250}.

Wie bei der Übertragung von Ergebnissen zwischen verschiedenen Spezies, sind auch Rückschlüsse vom zellulären Modell auf die Organ- oder Ganztierebene allgemein nicht unproblematisch. In einem komplexen Organ wie dem Herzen, spielen *in-vivo* zahlreiche Faktoren und Phänomene eine Rolle, wie die Vor- und Nachlast, der Koronarfluss und die neuroendokrinen Faktoren, die den Effekt von Riociguat und Cinaciguat auf das Herz beeinflussen können. Der Effekt *in-vitro* kann *in-vivo* dadurch völlig unterschiedlich sein, da autoregulatorische Kompensationsmechanismen aktiviert werden (siehe Abschnitt 4.1). Eine Aussage über die Wirkung einer Substanz sollte daher nie ohne Betrachtung entsprechender *in-vivo* Untersuchungen getroffen werden.

4.7 Ausblick

In der vorliegenden Studie wurde der inotrope und lusitrope Effekt von Riociguat und Cinaciguat auf isolierte Rattenkardiomyozyten untersucht. In der Literatur finden sich Hinweise, dass Riociguat und Cinaciguat synergistisch bzw. additiv mit NO-Donatoren wirken. Durch die gemeinsame Zugabe zeigte sich *in-vitro* eine erhöhte sGC-Aktivität^{116,128,133,144}. Über die Auswirkungen einer Kombinationstherapie auf die Kontraktion isolierter Kardiomyozyten kann mit den hier erhobenen Daten keine Aussage getroffen werden. Ob durch eine Kombination der Substanzen die sGC hinreichend aktiviert und zur Produktion von cGMP angeregt werden kann, um einen vorteilhaften Effekt auf die Lusitropie zu induzieren, könnte in weiterführenden Studien näher untersucht werden. Das in dieser Arbeit vorgestellte Zellmodell stellt hierfür ein geeignetes Werkzeug dar. Cinaciguat hat zusätzlich ein verbessertes Wirkungsprofil bei oxidativem Stress, weshalb bei kardiovaskulären Erkrankungen ein vielversprechender Effekt erwartet wird^{76,128,144}. Die relative Aktivierung der sGC durch Cinaciguat ist nach Vorbehandlung mit dem sGC-Inhibitor ODQ nachweislich verstärkt im Vergleich zur Veränderung in unbehandelten Zellen^{71,239}. ODQ führt zur Oxidation der sGC, ein Effekt, der unter anderem für die verschlechterte Bioverfügbarkeit von sGC bei kardiovaskulären Erkrankungen verantwortlich ist. Um die Wirkungsweise von Cinaciguat *in-vitro* besser auf die Wirkung bei kardiovaskulären Erkrankungen *in-vivo* zu übertragen wäre daher eine Untersuchung unter oxidativem Stress, z.B. mit ODQ, oder direkt mit Zellen von herzinsuffizienten Tieren von Interesse.

5 Zusammenfassung

Die Herzinsuffizienz ist eine Erkrankung, die unabhängig von ihrer Ätiologie durch eine Funktionsreduktion des linken und/oder rechten Ventrikels gekennzeichnet ist. Unabhängig von der Genese ist sie trotz medikamentöser und apparativer Therapiemaßnahmen mit einer hohen Morbidität und Mortalität verbunden. Neben Vasopressoren ist vor allem die Gabe von Vasodilatoren (Nitraten und NO-Donatoren) zur Vor- und Nachlastsenkung die Therapie der Wahl bei akut dekompensierter Herzinsuffizienz ohne schwerwiegende Hypotension. Die letztgenannten weisen zwar eine gute Wirksamkeit auf, jedoch kann es bei langer Therapiedauer zu einer Toleranzentwicklung kommen. Daher wurden neue Moleküle mit ähnlichem Wirkungsprofil entwickelt, sogenannte Stimulatoren (z.B. Riociguat) und Aktivatoren (z.B. Cinaciguat) der löslichen Guanylatzyklase (sGC). Sie aktivieren bzw. stimulieren die sGC unabhängig von NO. In klinischen und tierexperimentellen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die hämodynamischen Auswirkungen mit denen von NO-Donatoren vergleichbar sind, da die Substanzen keine Toleranzentwicklung induzieren. Cinaciguat weist zudem, gerade bei kardiovaskulären Erkrankungen, eine bessere Wirksamkeit auf. Unbekannt ist bisher, ob diese NO-unabhängigen sGC Stimulatoren und Aktivatoren direkte inotrope und lusitrope Effekte auf isolierte Kardiomyozyten ausüben.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es den Einfluss der sGC-Stimulatoren BAY 41-2772 (10^{-11} - 10^{-5} M) und Riociguat (10^{-10} - 10^{-5} M), sowie der sGC-Aktivatoren BAY 63-2770 (10^{-12} - 10^{-6} M) und Cinaciguat (10^{-10} - 10^{-5} M) *in-vitro* auf die Kontraktion und Relaxation, sowie auf die intrazellulären cAMP- und cGMP-Spiegel von isolierten Rattenkardiomyozyten zu untersuchen.

Zu diesem Zweck wurden mit Hilfe einer Langendorff-Anlage ventrikuläre Kardiomyozyten aus frisch entnommenen Rattenherzen isoliert und anschließend mit den obengenannten sGC-Stimulatoren und Aktivatoren stimuliert. Mit Hilfe eines „Video-Edge-Detection-Systems“, das an ein Fluoreszenzmikroskop gekoppelt ist, konnten die maximale Kontraktilität, die Kontraktionsgeschwindigkeit, die Relaxationsgeschwindigkeit und der Calcium-Transient ermittelt werden. Die inotropen und lusitropen Veränderungen wurden mit den Effekten von Isoproterenol, Verapamil und den NO-Donatoren (DEA/NO, SIN-1 Chlorid), verglichen. Mittels

Radioimmunoassay wurde die durch Stimulation mit Riociguat, Cinaciguat, Isoproterenol und DEA/NO induzierte cAMP- und cGMP-Konzentration in den isolierten Rattenkardiomyozyten gemessen.

Für Isoproterenol konnte eine konzentrationsabhängige (10^{-8} - 10^{-5} M) Zunahme der Inotropie und Lusitropie beobachtet werden, wohingegen für Verapamil eine konzentrationsabhängige Abnahme der Zellverkürzung (10^{-7} und 10^{-5} M), der Kontraktionsgeschwindigkeit (10^{-6} - 10^{-5} M) sowie der Relaxationsgeschwindigkeit (10^{-7} M) nachgewiesen werden konnte. Die Vorläufersubstanz von Riociguat BAY 41-2272 induzierte in hohen Konzentrationen (10^{-6} und 10^{-5} M) eine Zunahme sowohl der Kontraktilität wie auch der Relaxation. Nach Gabe der eigentlichen Prüfsubstanz Riociguat, sowie BAY 60-2770 und Cinaciguat konnte im Vergleich zu den NO-Donatoren (DEA/NO, SIN-1 Chlorid) keine Veränderung der Kontraktilität, Relaxation und des Calcium-Transienten der Herzmuskelzellen festgestellt werden. Ausschließlich in der höchsten Konzentration von DEA/NO konnte eine transiente Abnahme der Kontraktilität nach 2 Minuten beobachtet werden.

Aufgrund bereits gewonnener Daten an Tiermodellen, wie z.B. Hunden, aber auch an gesunden Probanden, wurde die Induktion eines positiv lusitropen Effekt nach Gabe der Stimulatoren und Aktivatoren angenommen. Diese Annahme konnte jedoch durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden, obwohl die Behandlung der Rattenkardiomyozyten mit DEA/NO und den Aktivatoren und Stimulatoren der sGC zu einem cGMP-Anstieg führten. Die verbesserte Relaxation in den vorangegangenen Studien ist eher eine Folge der Vor- und Nachlastsenkung aufgrund des vasodilatierenden Effektes unter den Stimulatoren und Aktivatoren der sGC, und weniger eine Folge eines direkt positiv lusitropen Effektes auf die Kardiomyozyten. Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Substanzen in den gewählten Konzentrationen keine nennenswerten Effekte auf isolierte Kardiomyozyten gesunder Ratten ausüben, weder hinsichtlich der Kontraktion noch der Relaxation. Ob Effekte an isolierten Kardiomyozyten von herzinsuffizienten Herzen oder in Kombination mit NO-Donatoren erreicht werden können, müssen zukünftige Untersuchungen erst noch zeigen.

6 Literaturverzeichnis

1. McMurray, J. J. & Stewart, S. Epidemiology, aetiology, and prognosis of heart failure. *Heart* **83**, 596–602 (2000).
2. Authors/Task Force Members *et al.* ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur. Heart J.* **33**, 1787–1847 (2012).
3. Effects of Enalapril on Mortality in Severe Congestive Heart Failure. *N. Engl. J. Med.* **316**, 1429–1435 (1987).
4. Packer, M. *et al.* Effect of Carvedilol on the Morbidity of Patients With Severe Chronic Heart Failure: Results of the Carvedilol Prospective Randomized Cumulative Survival (COPERNICUS) Study. *Circulation* **106**, 2194–2199 (2002).
5. Pitt, B. *et al.* The Effect of Spironolactone on Morbidity and Mortality in Patients with Severe Heart Failure. *N. Engl. J. Med.* **341**, 709–717 (1999).
6. Harald H.H. Schmidt, Schmidt, P. M. & Stasch, J.-P. NO- and Haem- Independent Soluble Guanylate Cyclase Activators. 2009 309–339 doi:10.1007/978-3-540-68964-5_14
7. Stasch, J. & Hobbs, A. NO-independent, haem-dependent soluble guanylate cyclase stimulators. *Handb Exp Pharmacol* 277–308 (2009).
8. Swedberg, K. *et al.* Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005). *Eur. Heart J.* **26**, 1115–1140 (2005).
9. Committee Members *et al.* ACC/AHA Guidelines for the Evaluation and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: Executive Summary A Report

- of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to Revise the 1995 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure). *Circulation* **104**, 2996–3007 (2001).
10. Haldeman, G. A., Croft, J. B., Giles, W. H. & Rashidee, A. Hospitalization of patients with heart failure: National Hospital Discharge Survey, 1985 to 1995. *Am. Heart J.* **137**, 352–360 (1999).
 11. Kannel, W. Incidence and Epidemiology of Heart Failure. *Heart Fail. Rev.* **5**, 167–173 (2000).
 12. Rousseau, M. F. *et al.* Progression of left ventricular dysfunction secondary to coronary artery disease, sustained neurohormonal activation and effects of ibopamine therapy during long-term therapy with angiotensin-converting enzyme inhibitor. *Am. J. Cardiol.* **73**, 488–493 (1994).
 13. Cohn, J. N. Plasma norepinephrine and mortality. *Clin. Cardiol.* **18**, I–9–I–12 (1995).
 14. Spinale, F. G. Myocardial Matrix Remodeling and the Matrix Metalloproteinases: Influence on Cardiac Form and Function. *Physiol. Rev.* **87**, 1285–1342 (2007).
 15. Pillai, J. B., Isbatan, A., Imai, S. & Gupta, M. P. Poly(ADP-ribose) Polymerase-1-dependent Cardiac Myocyte Cell Death during Heart Failure Is Mediated by NAD⁺ Depletion and Reduced Sir2 α Deacetylase Activity. *J. Biol. Chem.* **280**, 43121–43130 (2005).
 16. Tan, L., Jalil, J., Pick, R., Janicki, J. & Weber, K. Cardiac myocyte necrosis induced by angiotensin II. *Circ. Res.* **69**, 1185–1195 (1991).
 17. Opie, L. H., Commerford, P. J., Gersh, B. J. & Pfeffer, M. A. Controversies in ventricular remodelling. *The Lancet* **367**, 356–367

18. Cohn, J. N., Ferrari, R., Sharpe, N. & on Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *J. Am. Coll. Cardiol.* **35**, 569–582 (2000).
19. Takimoto, E. & Kass, D. A. Role of Oxidative Stress in Cardiac Hypertrophy and Remodeling. *Hypertension* **49**, 241–248 (2007).
20. Mann, D., Kent, R., Parsons, B. & Cooper, G. Adrenergic effects on the biology of the adult mammalian cardiocyte. *Circulation* **85**, 790–804 (1992).
21. Laribi, S. *et al.* Trends in death attributed to heart failure over the past two decades in Europe. *Eur. J. Heart Fail.* **14**, 234–239 (2012).
22. Moss, A. J. *et al.* Cardiac-Resynchronization Therapy for the Prevention of Heart-Failure Events. *N. Engl. J. Med.* **361**, 1329–1338 (2009).
23. Cleland, J. G. F. *et al.* The Effect of Cardiac Resynchronization on Morbidity and Mortality in Heart Failure. *N. Engl. J. Med.* **352**, 1539–1549 (2005).
24. Moss, A. J. *et al.* Improved Survival with an Implanted Defibrillator in Patients with Coronary Disease at High Risk for Ventricular Arrhythmia. *N. Engl. J. Med.* **335**, 1933–1940 (1996).
25. Bardy, G. H. *et al.* Amiodarone or an Implantable Cardioverter–Defibrillator for Congestive Heart Failure. *N. Engl. J. Med.* **352**, 225–237 (2005).
26. Moss, A. J. *et al.* Prophylactic Implantation of a Defibrillator in Patients with Myocardial Infarction and Reduced Ejection Fraction. *N. Engl. J. Med.* **346**, 877–883 (2002).
27. Borlaug, B. A. & Kass, D. A. Mechanisms of Diastolic Dysfunction in Heart Failure. *Trends Cardiovasc. Med.* **16**, 273–279 (2006).

28. Zile, M. R. & Brutsaert, D. L. New Concepts in Diastolic Dysfunction and Diastolic Heart Failure: Part I. *Circulation* **105**, 1387–1393 (2002).
29. Hirota, Y. A clinical study of left ventricular relaxation. *Circulation* **62**, 756–763 (1980).
30. Villars, P. S., Hamlin, S. K., Shaw, A. D. & Kanusky, J. T. Role of Diastole in Left Ventricular Function, I: Biochemical and Biomechanical Events. *Am. J. Crit. Care* **13**, 394–403 (2004).
31. Vittone, L., Mundiña-Weilenmann, C., Said, M., Ferrero, P. & Mattiazzi, A. Time Course and Mechanisms of Phosphorylation of Phospholamban Residues in Ischemia-reperfused Rat Hearts. Dissociation of Phospholamban Phosphorylation Pathways. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **34**, 39–50 (2002).
32. Zile, M. R. & Brutsaert, D. L. New Concepts in Diastolic Dysfunction and Diastolic Heart Failure: Part II. *Circulation* **105**, 1503–1508 (2002).
33. Borlaug, B. A. & Kass, D. A. Mechanisms of Diastolic Dysfunction in Heart Failure. *Trends Cardiovasc. Med.* **16**, 273–279 (2006).
34. Pasipoularides, A., Mirsky, I., Hess, O., Grimm, J. & Krayenbuehl, H. Myocardial relaxation and passive diastolic properties in man. *Circulation* **74**, 991–1001 (1986).
35. Weisfeldt, M. L., Frederiksen, J. W., Yin, F. C. P. & Weiss, J. L. JCI - Evidence of Incomplete Left Ventricular Relaxation in the Dog PREDICTION FROM THE TIME CONSTANT FOR ISOVOLUMIC PRESSURE FALL. *J Clin Invest.* **62**, 1296–1302 (1978).
36. Nash & Hunter. Computational Mechanics of the Heart. *Journal of Elasticity* **Volume 61**, 113–141 (2000).

37. Kostin, S., Hein, S., Arnon, E., Scholz, D. & Schaper, J. The cytoskeleton and related proteins in the human failing heart. *Heart Fail Rev* **5**, 271–80 (2000).
38. Kass, D. A. & Solaro, R. J. Mechanisms and Use of Calcium-Sensitizing Agents in the Failing Heart. *Circulation* **113**, 305–315 (2006).
39. Granzier, H. & Labeit, S. Cardiac titin: an adjustable multi-functional spring. *J. Physiol.* **541**, 335–342 (2002).
40. Wu, Y. *et al.* Changes in Titin Isoform Expression in Pacing-Induced Cardiac Failure Give Rise to Increased Passive Muscle Stiffness. *Circulation* **106**, 1384–1389 (2002).
41. Yamamoto, K. *et al.* Myocardial stiffness is determined by ventricular fibrosis, but not by compensatory or excessive hypertrophy in hypertensive heart. *Cardiovasc. Res.* **55**, 76–82 (2002).
42. Badenhorst, D. *et al.* Cross-linking influences the impact of quantitative changes in myocardial collagen on cardiac stiffness and remodelling in hypertension in rats. *Cardiovasc. Res.* **57**, 632–641 (2003).
43. Kögler, H. & Rüegg, J. Cardiac contractility: modulation of myofibrillar calcium sensitivity by beta-adrenergic stimulation. *Isr J Med Sci* **33**, 1–7 (1997).
44. Bassani, J. W., Bassani, R. A. & Bers, D. M. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. *J. Physiol.* **476**, 279–293 (1994).
45. Lompré, A.-M., Anger, M. & Levitsky, D. Sarco(endo)plasmic Reticulum Calcium Pumps in the Cardiovascular System: Function and Gene Expression. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **26**, 1109–1121 (1994).

46. Frank, K. F., Bölck, B., Erdmann, E. & Schwinger, R. H. . Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase modulates cardiac contraction and relaxation. *Cardiovasc. Res.* **57**, 20–27 (2003).
47. Wegener, A. D., Simmerman, H. K., Lindemann, J. P. & Jones, L. R. Phospholamban phosphorylation in intact ventricles. Phosphorylation of serine 16 and threonine 17 in response to beta-adrenergic stimulation. *J. Biol. Chem.* **264**, 11468–11474 (1989).
48. Li, L., Desantiago, J., Chu, G., Kranias, E. G. & Bers, D. M. Phosphorylation of phospholamban and troponin I in β -adrenergic-induced acceleration of cardiac relaxation. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* **278**, H769–H779 (2000).
49. Zhang, R., Zhao, J., Mandveno, A. & Potter, J. D. Cardiac Troponin I Phosphorylation Increases the Rate of Cardiac Muscle Relaxation. *Circ. Res.* **76**, 1028–1035 (1995).
50. Fentzke, R. C. *et al.* Impaired cardiomyocyte relaxation and diastolic function in transgenic mice expressing slow skeletal troponin I in the heart. *J. Physiol.* **517**, 143–157 (1999).
51. Kentish, J. C. *et al.* Phosphorylation of Troponin I by Protein Kinase A Accelerates Relaxation and Crossbridge Cycle Kinetics in Mouse Ventricular Muscle. *Circ. Res.* **88**, 1059–1065 (2001).
52. Layland, J., Solaro, R. J. & Shah, A. M. Regulation of cardiac contractile function by troponin I phosphorylation. *Cardiovasc. Res.* **66**, 12–21 (2005).
53. Layland, J. *et al.* Essential role of troponin I in the positive inotropic response to isoprenaline in mouse hearts contracting auxotonically. *J. Physiol.* **556**, 835–847 (2004).

54. Hasenfuss, G. *et al.* Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ. Res.* **75**, 434–442 (1994).
55. Bers, D. M. Altered Cardiac Myocyte Ca Regulation In Heart Failure. *Physiology* **21**, 380–387 (2006).
56. Markwalder, J. & Starling, E. H. On the constancy of the systolic output under varying conditions. *J. Physiol.* **48**, 348–356 (1914).
57. Patterson, S. W., Piper, H. & Starling, E. H. The regulation of the heart beat. *J. Physiol.* **48**, 465–513 (1914).
58. Kitzman, D. W., Higginbotham, M. B., Cobb, F. R., Sheikh, K. H. & Sullivan, M. J. Exercise intolerance in patients with heart failure and preserved left ventricular systolic function: Failure of the Frank-Starling mechanism. *J. Am. Coll. Cardiol.* **17**, 1065–1072 (1991).
59. Braunwald, E. & Ross Jr., J. The ventricular end-diastolic pressure: Appraisal of its value in the recognition of ventricular failure in man. *Am. J. Med.* **34**, 147–150 (1963).
60. Little, W., Kitzman, D. & Cheng, C.-P. Diastolic Dysfunction as a Cause of Exercise Intolerance. *Heart Fail. Rev.* **5**, 301–306 (2000).
61. Arnold, W. P., Mittal, C. K., Katsuki, S. & Murad, F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**, 3203–3207 (1977).
62. Murad, F. Nitric Oxide and Cyclic GMP in Cell Signaling and Drug Development. *N. Engl. J. Med.* **355**, 2003–2011 (2006).
63. Barouch, L. A. *et al.* Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature* **416**, 337–339 (2002).

64. Castro, L. R. V., Verde, I., Cooper, D. M. F. & Fischmeister, R. Cyclic Guanosine Monophosphate Compartmentation in Rat Cardiac Myocytes. *Circulation* **113**, 2221 –2228 (2006).
65. Feil, R., Lohmann, S. M., de Jonge, H., Walter, U. & Hofmann, F. Cyclic GMP-Dependent Protein Kinases and the Cardiovascular System. *Circ. Res.* **93**, 907 – 916 (2003).
66. Lucas, K. A. *et al.* Guanylyl Cyclases and Signaling by Cyclic GMP. *Pharmacol. Rev.* **52**, 375 –414 (2000).
67. Hofmann, F. The Biology of Cyclic GMP-dependent Protein Kinases. *J. Biol. Chem.* **280**, 1 –4 (2005).
68. Watanabe, A. & Besch, H. Interaction between cyclic adenosine monophosphate and cyclic guanosine monophosphate in guinea pig ventricular myocardium. *Circ. Res.* **37**, 309 –317 (1975).
69. Zaccolo, M. & Movsesian, M. A. cAMP and cGMP Signaling Cross-Talk. *Circ. Res.* **100**, 1569 –1578 (2007).
70. Ignarro, L. J., Adams, J. B., Horwitz, P. M. & Wood, K. S. Activation of soluble guanylate cyclase by NO-hemoproteins involves NO-heme exchange. Comparison of heme-containing and heme-deficient enzyme forms. *J. Biol. Chem.* **261**, 4997 – 5002 (1986).
71. Schrammel, A., Behrends, S., Schmidt, K., Koesling, D. & Mayer, B. Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Mol. Pharmacol.* **50**, 1 –5 (1996).

72. Gryglewski, R. J., Palmer, R. M. J. & Moncada, S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* **320**, 454–456 (1986).
73. Mollnau, H. *et al.* Mechanisms of Increased Vascular Superoxide Production in an Experimental Model of Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 2554–2559 (2005).
74. Pacher, P., Beckman, J. S. & Liaudet, L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol. Rev.* **87**, 315–424 (2007).
75. Harrison, D. G., Hua Cai, Landmesser, U. & Griendling, K. K. The Pickering Lecture British Hypertension Society, 10th September 2002: Interactions of angiotensin II with NAD(P)H oxidase, oxidant stress and cardiovascular disease. *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* **4**, 51–61 (2003).
76. Stasch, J.-P. *et al.* Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels. *J. Clin. Invest.* **116**, 2552–2561 (2006).
77. Melichar, V. O. *et al.* Reduced cGMP signaling associated with neointimal proliferation and vascular dysfunction in late-stage atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 16671–16676 (2004).
78. Hare, J. M. & Stamler, J. S. NO/redox disequilibrium in the failing heart and cardiovascular system. *J. Clin. Invest.* **115**, 509–517 (2005).
79. Weber, M., Lauer, N., Mülsch, A. & Kojda, G. The effect of peroxynitrite on the catalytic activity of soluble guanylyl cyclase. *Free Radic. Biol. Med.* **31**, 1360–1367 (2001).
80. Munzel, T., Sayegh, H., Freeman, B., Tarpey, M. & Harrison, D. Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. A novel

- mechanism underlying tolerance and cross-tolerance. *J Clin Invest* **95**, 187–94 (1995).
81. Münzel, T., Daiber, A. & Mülsch, A. Explaining the Phenomenon of Nitrate Tolerance. *Circ. Res.* **97**, 618–628 (2005).
 82. Münzel, T., Daiber, A. & Gori, T. Nitrate Therapy. *Circulation* **123**, 2132–2144 (2011).
 83. Packer, M. *et al.* Prevention and Reversal of Nitrate Tolerance in Patients with Congestive Heart Failure. *N. Engl. J. Med.* **317**, 799–804 (1987).
 84. Sydow, K. *et al.* Central role of mitochondrial aldehyde dehydrogenase and reactive oxygen species in nitroglycerin tolerance and cross-tolerance. *J. Clin. Invest.* **113**, 482–489 (2004).
 85. Gori, T. *et al.* Folic Acid Prevents Nitroglycerin-Induced Nitric Oxide Synthase Dysfunction and Nitrate Tolerance. *Circulation* **104**, 1119–1123 (2001).
 86. Thomas, G. R., DiFabio, J. M., Gori, T. & Parker, J. D. Once Daily Therapy With Isosorbide-5-Mononitrate Causes Endothelial Dysfunction in Humans: Evidence of a Free-Radical-Mediated Mechanism. *J. Am. Coll. Cardiol.* **49**, 1289–1295 (2007).
 87. Sayed, N. *et al.* Nitroglycerin-Induced S-nitrosylation and Desensitization of Soluble Guanylyl Cyclase Contribute to Nitrate Tolerance. *Circ. Res.* **103**, 606–614 (2008).
 88. Kim, H. E. *et al.* Disruption of the myocardial extracellular matrix leads to cardiac dysfunction. *J clin Invest.* **106**, 857–866 (2000).
 89. Marsh, N. & Marsh, A. A Short History Of Nitroglycerine And Nitric Oxide In Pharmacology And Physiology. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **27**, 313–319 (2000).

90. Parker, J. D. & Parker, J. O. Nitrate Therapy for Stable Angina Pectoris. *N. Engl. J. Med.* **338**, 520–531 (1998).
91. Shah, A. M. & MacCarthy, P. A. Paracrine and autocrine effects of nitric oxide on myocardial function. *Pharmacol. Ther.* **86**, 49–86 (2000).
92. Kelly, R. A., Balligand, J.-L. & Smith, T. W. Nitric Oxide and Cardiac Function. *Circ. Res.* **79**, 363–380 (1996).
93. Ziolo, M. T., Kohr, M. J. & Wang, H. Nitric oxide signaling and the regulation of myocardial function. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **45**, 625–632 (2008).
94. Casadei, B. & Sears, C. E. Nitric-oxide-mediated regulation of cardiac contractility and stretch responses. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **82**, 67–80 (2003).
95. Hare, J. M. & Colucci, W. S. Role of nitric oxide in the regulation of myocardial function. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **38**, 155–166 (1995).
96. Shah, A., Spurgeon, H., Sollott, S., Talo, A. & Lakatta, E. 8-bromo-cGMP reduces the myofilament response to Ca²⁺ in intact cardiac myocytes. *Circ. Res.* **74**, 970 – 978 (1994).
97. Smith, J. A., Shah, A. M. & Lewis, M. J. Factors released from endocardium of the ferret and pig modulate myocardial contraction. *J. Physiol.* **439**, 1–14 (1991).
98. Shah, A. M., Prendergast, B. D., Grocott-Mason, R., Lewis, M. J. & Paulus, W. J. The influence of endothelium-derived nitric oxide on myocardial contractile function. *Int. J. Cardiol.* **50**, 225–231 (1995).
99. Mohan, P., Brutsaert, D. L., Paulus, W. J. & Sys, S. U. Myocardial Contractile Response to Nitric Oxide and cGMP. *Circulation* **93**, 1223–1229 (1996).
100. Grocott-Mason, R., Fort, S., Lewis, M. J. & Shah, A. M. Myocardial relaxant effect of exogenous nitric oxide in isolated ejecting hearts. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* **266**, H1699–H1705 (1994).

101. Prendergast, B. D., Sci, B. M., Sagach, V. F. & Shah, A. M. Basal Release of Nitric Oxide Augments the Frank-Starling Response in the Isolated Heart. *Circulation* **96**, 1320–1329 (1997).
102. Paulus, W., Vantrimpont, P. & Shah, A. Acute effects of nitric oxide on left ventricular relaxation and diastolic distensibility in humans. Assessment by bicoronary sodium nitroprusside infusion. *Circulation* **89**, 2070–2078 (1994).
103. Matter, C. M. *et al.* Effect of NO Donors on LV Diastolic Function in Patients With Severe Pressure-Overload Hypertrophy. *Circulation* **99**, 2396–2401 (1999).
104. Layland, J., Li, J.-M. & Shah, A. M. Role of cyclic GMP-dependent protein kinase in the contractile response to exogenous nitric oxide in rat cardiac myocytes. *J. Physiol.* **540**, 457–467 (2002).
105. Kaye, D. M., Wiviott, S. D. & Kelly, R. A. Activation of Nitric Oxide Synthase (NOS3) by Mechanical Activity Alters Contractile Activity in a Ca²⁺-Independent Manner in Cardiac Myocytes: Role of Troponin I Phosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **256**, 398–403 (1999).
106. Shah, A. M., Lewis, M. J. & Henderson, A. H. Effects of 8-Bromo-cyclic GMP on contraction and on inotropic response of ferret cardiac muscle. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **23**, 55–64 (1991).
107. Jiang, L. H. *et al.* Regulation of Cloned Cardiac L-type Calcium Channels by cGMP-dependent Protein Kinase. *J. Biol. Chem.* **275**, 6135–6143 (2000).
108. Cornwell, T. L., Pryzwansky, K. B., Wyatt, T. A. & Lincoln, T. M. Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.* **40**, 923–931 (1991).

109. Zhang, Y. H. *et al.* Reduced Phospholamban Phosphorylation Is Associated With Impaired Relaxation in Left Ventricular Myocytes From Neuronal NO Synthase-Deficient Mice. *Circ. Res.* **102**, 242–249 (2008).
110. Garofalo, F., Parisella, M. L., Amelio, D., Tota, B. & Imbrogno, S. Phospholamban S-nitrosylation modulates Starling response in fish heart. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **276**, 4043–4052 (2009).
111. Takeshi, A. Modulation of Vascular Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase in Cardiovascular Pathophysiology. *Cardiovasc. Pharmacol. Heart Circ.* **Volume 59**, 165–195 (2010).
112. Froehlich, J. P. *et al.* Phospholamban Thiols Play a Central Role in Activation of the Cardiac Muscle Sarcoplasmic Reticulum Calcium Pump by Nitroxyl[†]. *Biochemistry (Mosc.)* **47**, 13150–13152 (2008).
113. Krüger, M. *et al.* Protein Kinase G Modulates Human Myocardial Passive Stiffness by Phosphorylation of the Titin Springs. *Circ. Res.* **104**, 87–94 (2009).
114. Ko, F., Wu, C., Kuo, S., Lee, F. & Teng, C. YC-1, a novel activator of platelet guanylate cyclase. *Blood* **84**, 4226–4233 (1994).
115. Evgenov, O. V. *et al.* NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* **5**, 755–768 (2006).
116. Stasch, J.-P. *et al.* NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. *Nature* **410**, 212–215 (2001).
117. Straub, A. *et al.* NO-independent stimulators of soluble guanylate cyclase. *Bioorg Med Chem Lett* **11**, 781–4 (2001).

118. Evgenov, O. V. *et al.* Soluble Guanylate Cyclase Activator Reverses Acute Pulmonary Hypertension and Augments the Pulmonary Vasodilator Response to Inhaled Nitric Oxide in Awake Lambs. *Circulation* **110**, 2253–2259 (2004).
119. Boerrigter, G. & Burnett, J. C. Soluble Guanylate Cyclase. *Circulation* **119**, 2752–2754 (2009).
120. Mullershausen, F., Russwurm, M., Friebe, A. & Koesling, D. Inhibition of Phosphodiesterase Type 5 by the Activator of Nitric Oxide–Sensitive Guanylyl Cyclase BAY 41-2272. *Circulation* **109**, 1711–1713 (2004).
121. Bischoff, E. & Stasch, J.-P. Effects of the sGC Stimulator BAY 41-2272 Are Not Mediated by Phosphodiesterase 5 Inhibition. *Circulation* **110**, e320–e321 (2004).
122. Boerrigter, G. & Burnett, J. C. Nitric Oxide–Independent Stimulation of Soluble Guanylate Cyclase with BAY 41-2272 in Cardiovascular Disease. *Cardiovasc. Drug Rev.* **25**, 30–45 (2007).
123. Boerrigter, G. *et al.* Cardiorenal and Humoral Properties of a Novel Direct Soluble Guanylate Cyclase Stimulator BAY 41-2272 in Experimental Congestive Heart Failure. *Circulation* **107**, 686–689 (2003).
124. Priviero, F. B. *et al.* Mechanisms underlying relaxation of rabbit Aorta by BAY 41-2272, a nitric oxide-independent soluble guanylate cyclase activator. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **32**, 728–734 (2005).
125. Bawankule, D. U. *et al.* BAY 41-2272 [5-Cyclopropyl-2-[1-(2-fluoro-benzyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-3-yl]pyrimidin-4-ylamine]-Induced Dilation in Ovine Pulmonary Artery: Role of Sodium Pump. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **314**, 207–213 (2005).
126. Teixeira, C. E., Priviero, F. B. M. & Webb, R. C. Molecular Mechanisms Underlying Rat Mesenteric Artery Vasorelaxation Induced by the Nitric Oxide-

- Independent Soluble Guanylyl Cyclase Stimulators BAY 41-2272 [5-Cyclopropyl-2-[1-(2-fluorobenzyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-3-yl]pyrimidin-4-ylamine] and YC-1 [3-(5'-Hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzyl Indazole]. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **317**, 258–266 (2006).
127. Deruelle, P. *et al.* BAY 41-2772, a direct activator of soluble guanylate cyclase reduces right ventricular hypertrophy and prevents pulmonary vascular remodeling during chronic hypoxia in neonatal rats. *31.03.2006* **90**, 135–144
128. Hobbs, A. J. Soluble guanylate cyclase: an old therapeutic target re-visited. *Br. J. Pharmacol.* **136**, 637–640 (2002).
129. Zanfolin, M. *et al.* Protective Effects of BAY 41-2272 (sGC Stimulator) on Hypertension, Heart, and Cardiomyocyte Hypertrophy Induced by Chronic L-NAME Treatment in Rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **47**, 391–395 (2006).
130. Joshi, C. N. *et al.* The Soluble Guanylate Cyclase Stimulator BAY 41-2272 Inhibits Vascular Smooth Muscle Growth through the cAMP-Dependent Protein Kinase and cGMP-Dependent Protein Kinase Pathways. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **339**, 394–402 (2011).
131. Hobbs, A. J. & Moncada, S. Antiplatelet properties of a novel, non-NO-based soluble guanylate cyclase activator, BAY 41-2272. *Vascul. Pharmacol.* **40**, 149–154 (2003).
132. Roger, S. *et al.* The anti-aggregating effect of BAY 41-2272, a stimulator of soluble guanylyl cyclase, requires the presence of nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.* **161**, 1044–1058 (2010).
133. Schermuly, R. T. *et al.* Expression and function of soluble guanylate cyclase in pulmonary arterial hypertension. *Eur. Respir. J.* **32**, 881–891 (2008).

134. Geschka, S. *et al.* Soluble Guanylate Cyclase Stimulation Prevents Fibrotic Tissue Remodeling and Improves Survival in Salt-Sensitive Dahl Rats. *PLoS ONE* **6**, e21853 (2011).
135. Frey, R. *et al.* Single-Dose Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, Tolerability, and Safety of the Soluble Guanylate Cyclase Stimulator BAY 63-2521: An Ascending-Dose Study in Healthy Male Volunteers. *J. Clin. Pharmacol.* **48**, 926 – 934 (2008).
136. Grimminger, F. *et al.* First acute haemodynamic study of soluble guanylate cyclase stimulator riociguat in pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* **33**, 785 –792 (2009).
137. Ghofrani, H. A. *et al.* Riociguat for chronic thromboembolic pulmonary hypertension and pulmonary arterial hypertension: a phase II study. *Eur. Respir. J.* **36**, 792 –799 (2010).
138. Ghofrani, H.-A. *et al.* Riociguat for the Treatment of Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. *N. Engl. J. Med.* **369**, 319–329 (2013).
139. Ghofrani, H.-A. *et al.* Riociguat for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *N. Engl. J. Med.* **369**, 330–340 (2013).
140. European Medicines Agency - - Adempas. at http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002737/human_med_001733.jsp
141. Mitrovic, V. *et al.* Acute hemodynamic response to single oral doses of BAY 60-4552, a soluble guanylate cyclase stimulator, in patients with biventricular heart failure. *BMC Pharmacol.* **9**, P51 (2009).
142. Bondermann, D. *et al.* Acute hemodynamic effects of riociguat in patients with pulmonary hypertension associated with diastolic heart failure (DILATE-1): A

- randomized, double-blind, placebo-controlled, single-dose study. *Eur. Heart J.* **34**, (2013).
143. Bonderman, D. *et al.* Riociguat for Patients With Pulmonary Hypertension Caused by Systolic Left Ventricular Dysfunction: A Phase IIb Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled, Dose-Ranging Hemodynamic Study. *Circulation* **128**, 502–511 (2013).
144. Stasch, J.-P. *et al.* NO- and haem-independent activation of soluble guanylyl cyclase: molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle. *Br. J. Pharmacol.* **136**, 773–783 (2002).
145. Schmidt, P., Schramm, M., Schröder, H. & Stasch, J.-P. Mechanisms of nitric oxide independent activation of soluble guanylyl cyclase. *Eur. J. Pharmacol.* **468**, 167–174 (2003).
146. Boerrigter, G. *et al.* Targeting Heme-Oxidized Soluble Guanylate Cyclase in Experimental Heart Failure. *Hypertension* **49**, 1128–1133 (2007).
147. Korkmaz, S. *et al.* Pharmacological Activation of Soluble Guanylate Cyclase Protects the Heart Against Ischemic Injury. *Circulation* **120**, 677–686 (2009).
148. Frey, R. *et al.* Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, Tolerability, and Safety of the Soluble Guanylate Cyclase Activator Cinaciguat (BAY 58-2667) in Healthy Male Volunteers. *J. Clin. Pharmacol.* **48**, 1400–1410 (2008).
149. Lapp, H. *et al.* Cinaciguat (BAY 58–2667) Improves Cardiopulmonary Hemodynamics in Patients With Acute Decompensated Heart Failure. *Circulation* **119**, 2781–2788 (2009).
150. Erdmann, E. *et al.* Cinaciguat, a soluble guanylate cyclase activator, unloads the heart but also causes hypotension in acute decompensated heart failure. *Eur. Heart J.* (2012).

151. Gheorghiadu, M. *et al.* Cinaciguat, a soluble guanylate cyclase activator: results from the randomized, controlled, phase IIb COMPOSE programme in acute heart failure syndromes. *Eur. J. Heart Fail.* **14**, 1056–1066 (2012).
152. Roger, S. *et al.* Anti-aggregating effect of BAY 58-2667, an activator of soluble guanylyl cyclase. *Vascul. Pharmacol.* **53**, 281–287 (November).
153. Krieg, T. *et al.* BAY 58-2667, a nitric oxide-independent guanylyl cyclase activator, pharmacologically post-conditions rabbit and rat hearts. *Eur. Heart J.* **30**, 1607–1613 (2009).
154. Dumitrascu, R. *et al.* Activation of Soluble Guanylate Cyclase Reverses Experimental Pulmonary Hypertension and Vascular Remodeling. *Circulation* **113**, 286–295 (2006).
155. Flesch, M. *et al.* Acute Effects of Nitric Oxide and Cyclic GMP on Human Myocardial Contractility. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **281**, 1340–1349 (1997).
156. Bramlage, P. *et al.* Computer-Aided Measurement of Cell Shortening and Calcium Transients in Adult Cardiac Myocytes. *Biotechnol. Prog.* **17**, 929–934 (2001).
157. Piper, H. M., Volz, A. & Schwartz, P. in *Cell Culture Techniques in Heart and Vessel Research* (ed. Piper, H. M.) 36–60 (Springer Berlin Heidelberg, 1990).
158. Kubin, T. *et al.* Microvascular endothelial cells remodel cultured adult cardiomyocytes and increase their survival. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* **276**, H2179–H2187 (1999).
159. Skrzypiec-Spring, M., Grotthus, B., Szelać, A. & Schulz, R. Isolated heart perfusion according to Langendorff—Still viable in the new millennium. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **55**, 113–126 (2007).

160. Bell, R. M., Mocanu, M. M. & Yellon, D. M. Retrograde heart perfusion: The Langendorff technique of isolated heart perfusion. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **50**, 940–950 (2011).
161. Multiplex Assays, ELISAs and RIAs by Research Area - Millipore. at <<http://www.millipore.com/bmia/flx4/biomarkers-immunoassays-multiplex-assays-elisa-ria>>
162. Capogrossi, M. C., Suarez-Isla, B. A. & Lakatta, E. G. The interaction of electrically stimulated twitches and spontaneous contractile waves in single cardiac myocytes. *J. Gen. Physiol.* **88**, 615–633 (1986).
163. Sutherland, F. J. & Hearse, D. J. The isolated blood and perfusion fluid perfused heart. *Pharmacol. Res.* **41**, 613–627 (2000).
164. Bers, D. M. Calcium Fluxes Involved in Control of Cardiac Myocyte Contraction. *Circ. Res.* **87**, 275–281 (2000).
165. Powell, T. Isolated adult heart cells. The development of a new experimental model. *Basic Res Cardiol Suppl*, 9–12 (1985).
166. Cowley, A. W., Liard, J. F. & Guyton, A. C. Role of the Baroreceptor Reflex in Daily Control of Arterial Blood Pressure and Other Variables in Dogs. *Circ. Res.* **32**, 564–576 (1973).
167. Mancia, G. *et al.* Arterial baroreflexes and blood pressure and heart rate variabilities in humans. *Hypertension* **8**, 147–153 (1986).
168. Vatner, S., Higgins, C. & Braunwald, E. Sympathetic and parasympathetic components of reflex tachycardia induced by hypotension in conscious dogs with and without heart failure. *Cardiovasc. Res.* **8**, 153–161 (1974).
169. Kranias, E. G. & Solaro, R. J. Phosphorylation of troponin I and phospholamban during catecholamine stimulation of rabbit heart. *Nature* **298**, 182–184 (1982).

170. Chen, P. P., Patel, J. R., Rybakova, I. N., Walker, J. W. & Moss, R. L. Protein kinase A-induced myofilament desensitization to Ca²⁺ as a result of phosphorylation of cardiac myosin-binding protein C. *J. Gen. Physiol.* **136**, 615 – 627 (2010).
171. Pinsky, D. J. *et al.* Mechanical Transduction of Nitric Oxide Synthesis in the Beating Heart. *Circ. Res.* **81**, 372 –379 (1997).
172. Resar, J. R. *et al.* Direct evidence that coronary perfusion affects diastolic myocardial mechanical properties in canine heart. *Cardiovasc. Res.* **27**, 403 –410 (1993).
173. Gregg, D. E. Effect of Coronary Perfusion Pressure or Coronary Flow on Oxygen Usage of the Myocardium. *Circ. Res.* **13**, 497 –500 (1963).
174. Salisbury, P. F., Cross, C. E. & Rieben, P. A. Influence of Coronary Artery Pressure Upon Myocardial Elasticity. *Circ. Res.* **8**, 794 –800 (1960).
175. Arnold, G., Kosche, F., Miessner, E., Neitzert, A. & Lochner, W. The importance of the perfusion pressure in the coronary arteries for the contractility and the oxygen consumption of the heart. *Pflugers Arch Gesamte Physiol Menschen Tiere* **299**, 339–56 (1968).
176. Beaucage, P., Massicotte, J., Jasmin, G. & Dumont, L. Role of Nitric Oxide Synthase, Cytochrome P-450, and Cyclooxygenase in the Inotropic and Lusitropic Cardiac Response to Increased Coronary Perfusion. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **40**, 96–105 (2002).
177. Lamberts, R. R. *et al.* Increased coronary perfusion augments cardiac contractility in the rat through stretch-activated ion channels. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* **282**, H1334 –H1340 (2002).

178. Vittone, L., Mundina-Weilenmann, C., Mattiazzi, A. & Cingolani, H. Physiologic and pharmacologic factors that affect myocardial relaxation. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **32**, 7–18 (1994).
179. Momomura, S., Iizuka, M., Serizawa, T. & Sugimoto, T. Separation of rate of left ventricular relaxation from chamber stiffness in rats. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* **255**, H1468 –H1475 (1988).
180. Diagnostische Herzkatheteruntersuchung. *Clin. Res. Cardiol.* **97**, 475–512 (2008).
181. Weiss, J. L., Frederiksen, J. W. & Weisfeldt, M. L. Hemodynamic determinants of the time-course of fall in canine left ventricular pressure. *J. Clin. Invest.* **58**, 751–760 (1976).
182. Gottdiener, J. S. *et al.* American Society of Echocardiography recommendations for use of echocardiography in clinical trials. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* **17**, 1086–1119
183. Nagueh, S. F. *et al.* Recommendations for the Evaluation of Left Ventricular Diastolic Function by Echocardiography. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* **22**, 107–133
184. Staudt, A. *et al.* β 1-adrenoceptor antibodies induce positive inotropic response in isolated cardiomyocytes. *Eur. J. Pharmacol.* **423**, 115–119 (2001).
185. Hensley, J., Billman, G. E., Johnson, J. D., Hohl, C. M. & Altschuld, R. A. Effects of Calcium Channel Antagonists on Ca^{2+} Transients in Rat and Canine Cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **29**, 1037–1043 (1997).
186. Sulakhe, P. & Vo, X. Regulation of phospholamban and troponin-I phosphorylation in the intact rat cardiomyocytes by adrenergic and cholinergic stimuli: roles of cyclic nucleotides, calcium, protein kinases and phosphatases and depolarization. *Mol Cell Biochem* **149-150**, 103–26 (1995).

187. De Gende, A. O., Alzueta, D. P. & Cingolani, H. E. Effect of isoproterenol on relation between maximal rate of contraction and maximal rate of relaxation. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* **233**, H404 –H409 (1977).
188. Katz, A., Tada, M. & Kirchberger, M. Control of calcium transport in the myocardium by the cyclic AMP-Protein kinase system. *Adv Cycl. Nucleotide Res* **5**, 453–72 (1975).
189. Lindemann, J. P., Jones, L. R., Hathaway, D. R., Henry, B. G. & Watanabe, A. M. beta-Adrenergic stimulation of phospholamban phosphorylation and Ca²⁺-ATPase activity in guinea pig ventricles. *J. Biol. Chem.* **258**, 464 –471 (1983).
190. Morad, M. & Rolett, E. L. Relaxing effects of catecholamines on mammalian heart. *J. Physiol.* **224**, 537 –558 (1972).
191. Solaro, R. J., Moir, A. J. G. & Perry, S. V. Phosphorylation of troponin I and the inotropic effect of adrenaline in the perfused rabbit heart. *Nature* **262**, 615–617 (1976).
192. Bers, D. M. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* **415**, 198–205 (2002).
193. Sham, J. S., Jones, L. R. & Morad, M. Phospholamban mediates the beta-adrenergic-enhanced Ca²⁺ uptake in mammalian ventricular myocytes. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* **261**, H1344 –H1349 (1991).
194. Shinebourne, E. & White, R. Cyclic AMP and calcium uptake of the sarcoplasmic reticulum in relation to increased rate of relaxation under the influence of catecholamines. *Cardiovasc. Res.* **4**, 194 –200 (1970).
195. James, P., Inui, M., Tada, M., Chiesi, M. & Carafoli, E. Nature and site of phospholamban regulation of the Ca²⁺ pump of sarcoplasmic reticulum. *Nature* **342**, 90–92 (1989).

196. Pi, Y., Kemnitz, K. R., Zhang, D., Kranias, E. G. & Walker, J. W. Phosphorylation of Troponin I Controls Cardiac Twitch Dynamics. *Circ. Res.* **90**, 649–656 (2002).
197. Trautwein, W. & Hescheler, J. Regulation of cardiac L-type calcium current by phosphorylation and G proteins. *Annu Rev Physiol* **52**, 257–74 (1990).
198. Gao, T. *et al.* cAMP-Dependent Regulation of Cardiac L-Type Ca²⁺ Channels Requires Membrane Targeting of PKA and Phosphorylation of Channel Subunits. *Neuron* **19**, 185–196 (1997).
199. Kamp, T. J. & Hell, J. W. Regulation of Cardiac L-Type Calcium Channels by Protein Kinase A and Protein Kinase C. *Circ. Res.* **87**, 1095–1102 (2000).
200. Yoshida, A. *et al.* Phosphorylation of Ryanodine Receptors in Rat Myocytes during β -Adrenergic Stimulation. *J. Biochem. (Tokyo)* **111**, 186–190 (1992).
201. Fleckenstein, A. Specific pharmacology of calcium in myocardium, cardiac pacemakers, and vascular smooth muscle. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **17**, 149–66 (1977).
202. Abernethy, D. & Schwartz, J. Calcium-antagonist drugs. *N Engl J Med* **341**, 1447–57 (1999).
203. Wier, W. & Balke, C. Ca(2+) release mechanisms, Ca(2+) sparks, and local control of excitation-contraction coupling in normal heart muscle. *Circ Res* **85**, 770–6 (1999).
204. Henry, P. D. Comparative pharmacology of calcium antagonists: Nifedipine, verapamil and diltiazem. *Am. J. Cardiol.* **46**, 1047–1058 (1980).
205. Lee, K. S. & Tsien, R. W. Mechanism of calcium channel blockade by verapamil, D600, diltiazem and nitrendipine in single dialysed heart cells. *Nature* **302**, 790–794 (1983).

206. Schmidt, H. H. W., Schmidt, P. & Stasch, J.-P. in *cGMP: Generators, Effectors and Therapeutic Implications* (eds. Schmidt, H. H. W., Hofmann, F. & Stasch, J.-P.) **191**, 309–339 (Springer Berlin Heidelberg, 2009).
207. Xie, Y.-W. *et al.* Role of Endothelium-Derived Nitric Oxide in the Modulation of Canine Myocardial Mitochondrial Respiration In Vitro: Implications for the Development of Heart Failure. *Circ. Res.* **79**, 381–387 (1996).
208. Keefer, L. K., Nims, R. W., Davies, K. M. & Wink, D. A. ‘NONOates’ (1-substituted diazen-1-ium-1,2-diolates) as nitric oxide donors: Convenient nitric oxide dosage forms. *Nitric Oxide Part Sources Detect. NO NO Synthase* **Volume 268**, 281–293 (1996).
209. Feelisch, M. The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. *Naunyn-Schmiedberg’s archives of pharmacology* **358**, 113–122 (1998).
210. Paolocci, N. *et al.* cGMP-independent inotropic effects of nitric oxide and peroxyntirite donors: potential role for nitrosylation. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* **279**, H1982 –H1988 (2000).
211. Vila-Petroff, M. G., Younes, A., Egan, J., Lakatta, E. G. & Sollott, S. J. Activation of Distinct cAMP-Dependent and cGMP-Dependent Pathways by Nitric Oxide in Cardiac Myocytes. *Circ. Res.* **84**, 1020 –1031 (1999).
212. Kojda, G. *et al.* Low Increase in cGMP Induced by Organic Nitrates and Nitrovasodilators Improves Contractile Response of Rat Ventricular Myocytes. *Circ. Res.* **78**, 91 –101 (1996).
213. Kojda, G., Kottenberg, K., Stasch, J.-P., Schrör, K. & Noack, E. Positive inotropic effect of exogenous and endogenous NO in hypertrophic rat hearts. *Br. J. Pharmacol.* **122**, 813–820 (1997).

214. Sarkar, D., Vallance, P., Amirmansour, C. & Harding, S. E. Positive inotropic effects of NO donors in isolated guinea-pig and human cardiomyocytes independent of NO species and cyclic nucleotides. *Cardiovasc. Res.* **48**, 430–439 (2000).
215. González, D. R. *et al.* Differential role of S-nitrosylation and the NO–cGMP–PKG pathway in cardiac contractility. *Nitric Oxide* **18**, 157–167 (2008).
216. Brady, A. J., Warren, J. B., Poole-Wilson, P. A., Williams, T. J. & Harding, S. E. Nitric oxide attenuates cardiac myocyte contraction. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* **265**, H176–H182 (1993).
217. Kojda, G. & Kottenberg, K. Regulation of basal myocardial function by NO. *Cardiovasc. Res.* **41**, 514–523 (1999).
218. Khan, S. A. *et al.* Nitric Oxide Regulation of Myocardial Contractility and Calcium Cycling. *Circ. Res.* **92**, 1322–1329 (2003).
219. Chesnais, J.-M., Fischmeister, R. & Méry, P.-F. Positive and negative inotropic effects of NO donors in atrial and ventricular fibres of the frog heart. *J. Physiol.* **518**, 449–461 (1999).
220. Campbell, D. L., Stamler, J. S. & Strauss, H. C. Redox modulation of L-type calcium channels in ferret ventricular myocytes. Dual mechanism regulation by nitric oxide and S-nitrosothiols. *J. Gen. Physiol.* **108**, 277–293 (1996).
221. Wegener, J. W. *et al.* cGMP-Dependent Protein Kinase I Mediates the Negative Inotropic Effect of cGMP in the Murine Myocardium. *Circ. Res.* **90**, 18–20 (2002).
222. Wang, Y., Wagner, M. B., Joyner, R. W. & Kumar, R. cGMP-dependent protein kinase mediates stimulation of L-type calcium current by cGMP in rabbit atrial cells. *Cardiovasc. Res.* **48**, 310–322 (2000).

223. Zhang, Q., Scholz, P. M., He, Y., Tse, J. & Weiss, H. R. Cyclic GMP signaling and regulation of SERCA activity during cardiac myocyte contraction. *Cell Calcium* **37**, 259–266 (2005).
224. Zhang, Q., Scholz, P. M., Pilzak, A., Su, J. & Weiss, H. R. Role of Phospholamban in Cyclic GMP Mediated Signaling in Cardiac Myocytes. *Cell. Physiol. Biochem.* **20**, 157–166 (2007).
225. Lau, K.-L. *et al.* cGMP stimulates endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in vascular endothelial cells. *Life Sci.* **73**, 2019–2028 (2003).
226. Zhang, Q., Yan, L., Weiss, H. R. & Scholz, P. M. Cyclic GMP-Induced Reduction in Cardiac Myocyte Function Is Partially Mediated by Activation of the Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase. *Pharmacology* **64**, 106–112 (2002).
227. Nascimento, J. H. M., Sallé, L., Hoebeke, J., Argibay, J. & Peineau, N. cGMP-mediated inhibition of cardiac L-type Ca²⁺current by a monoclonal antibody against the M2 ACh receptor. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **281**, C1251–C1258 (2001).
228. Gallo, M. P. *et al.* Modulation of guinea-pig cardiac L-type calcium current by nitric oxide synthase inhibitors. *J. Physiol.* **506**, 639–651 (1998).
229. Suko, J. *et al.* Phosphorylation of serine 2843 in ryanodine receptor-calcium release channel of skeletal muscle by cAMP-, cGMP- and CaM-dependent protein kinase. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1175**, 193–206 (1993).
230. Hohenegger, M. & Suko, J. Phosphorylation of the purified cardiac ryanodine receptor by exogenous and endogenous protein kinases. *Biochem J* **296** (Pt 2), 303–8 (1993).

231. Mueck, W. & Frey, R. Population Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cinaciguat, a Soluble Guanylate Cyclase Activator, in Patients with Acute Decompensated Heart Failure. *Clin. Pharmacokinet.* **49**, 119–129 (2010).
232. Frey, R. *et al.* Pharmacokinetics of the Soluble Guanylate Cyclase Activator Cinaciguat in Individuals With Hepatic Impairment. *J. Clin. Pharmacol.* (2011).
233. Stasch, J.-P. *et al.* Pharmacological actions of a novel NO-independent guanylyl cyclase stimulator, BAY 41-8543: in vitro studies. *Br. J. Pharmacol.* **135**, 333–343 (2002).
234. Stasch, J.-P., Dembowski, K., Perzborn, E., Stahl, E. & Schramm, M. Cardiovascular actions of a novel NO-independent guanylyl cyclase stimulator, BAY 41-8543: in vivo studies. *Br. J. Pharmacol.* **135**, 344–355 (2002).
235. Hoffmann, M. & Thuss, U. Cardiovascular effects of the soluble guanylyl cyclase activator BAY 58-2667 in anesthetized dogs. *BMC Pharmacol.* **7**, P28 (2007).
236. Chester, M. *et al.* Cinaciguat, a soluble guanylate cyclase activator, augments cGMP after oxidative stress and causes pulmonary vasodilation in neonatal pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **301**, L755 – L764 (2011).
237. Vandendriessche B, B. *et al.* The Soluble Guanylate Cyclase Activator BAY 58-2667 Protects against Morbidity and Mortality in Endotoxic Shock by Recoupling Organ Systems. *PLoS ONE* **8**, 1–10 (2013).
238. Schulz, E., Jansen, T., Wenzel, P., Daiber, A. & Munzel, T. Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal* **10**, 1115–26 (2008).

239. Garthwaite, J. *et al.* Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol. Pharmacol.* **48**, 184–188 (1995).
240. Priviero, F. B. M., Zemse, S. M., Teixeira, C. E. & Webb, R. C. Oxidative Stress Impairs Vasorelaxation Induced by the Soluble Guanylyl Cyclase Activator BAY 41-2272 in Spontaneously Hypertensive Rats. *Am J Hypertens* **22**, 493–499 (2009).
241. Kalk, P. *et al.* NO-independent activation of soluble guanylate cyclase prevents disease progression in rats with 5/6 nephrectomy. *Br. J. Pharmacol.* **148**, 853–859 (2006).
242. Salloum, F. N. *et al.* Cinaciguat, a novel activator of soluble guanylate cyclase, protects against ischemia/reperfusion injury: role of hydrogen sulfide. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* **302**, H1347–H1354 (2012).
243. De Belder, A. J. *et al.* Nitric oxide synthase activities in human myocardium. *The Lancet* **341**, 84–85 (1993).
244. Haywood, G. A. *et al.* Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase in Human Heart Failure. *Circulation* **93**, 1087–1094 (1996).
245. Joe, E. K. *et al.* Regulation of Cardiac Myocyte Contractile Function by Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS): Mechanisms of Contractile Depression by Nitric Oxide. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **30**, 303–315 (1998).
246. Kumar, A. *et al.* Role of nitric oxide and cGMP in human septic serum-induced depression of cardiac myocyte contractility. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **276**, R265–R276 (1999).
247. Arai, M., Alpert, N., MacLennan, D., Barton, P. & Periasamy, M. Alterations in sarcoplasmic reticulum gene expression in human heart failure. A possible

- mechanism for alterations in systolic and diastolic properties of the failing myocardium. *Circ. Res.* **72**, 463–469 (1993).
248. Hasenfuss, G. & Pieske, B. Calcium Cycling in Congestive Heart Failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **34**, 951–969 (2002).
249. Pogwizd, S. M., Schlotthauer, K., Li, L., Yuan, W. & Bers, D. M. Arrhythmogenesis and Contractile Dysfunction in Heart Failure: Roles of Sodium-Calcium Exchange, Inward Rectifier Potassium Current, and Residual β -Adrenergic Responsiveness. *Circ. Res.* **88**, 1159–1167 (2001).
250. Bers, D. M., Eisner, D. A. & Valdivia, H. H. Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} and Heart Failure. *Circ. Res.* **93**, 487–490 (2003).

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.:	Abbildung
AC:	Adenylatzyklase
ADHF:	Akute dekompensierte Herzinsuffizienz, akute kongestive Herzinsuffizienz
AHA:	American Heart Association
ALDH2:	Aldehyd Dehydrogenase 2
ANP:	Atriales Natriuretisches Peptid
ApoE:	Apolipoprotein E
Aqua dest:	destilliertes Wasser
ATP:	Adenosintriphosphat
BCA:	Bicinchoninsäure
bl peak h%:	maximale Kontraktilität
bl:	maximale Zelllänge
BL:	Baseline
BNP:	Brain Natriuretisches Peptid
8-br-cGMP:	8-Bromo-cGMP
BSA:	Bovines Serum Albumin
Ca ²⁺ :	Calcium
CaCl ₂ :	Calciumchlorid
cAMP:	zyklisches atriuretisches Monophosphat
cGMP:	zyklisches Guanosinmonophosphat
CNP:	C-Typ natriuretisches Peptid
CO ₂ :	Kohlendioxid
COX:	Cyclooxygenase
CRT:	kardiale Resynchronisationstherapie
CTEPH:	Chronisch Thrombembolische Pulmonale Hypertension
DEA/NO:	Diethylamin Nonate
dep v:	Kontraktionsgeschwindigkeit
DMSO:	Dimethylsulfoxid

-dp/dt _{max} :	Druckabfall
EDP:	Enddiastolischer Druck
EDRF: :	Endothelial-derived- Relaxing Factors
EDV:	Enddiastolisches Volumen
ELISA:	Enzyme – linked - immunosorbent Assay
eNOS:	endotheliale NO-Synthase
Fura-2-AM:	Fura-2-Acetoxymethylester
Fe ²⁺ /Fe ³⁺ :	reduziertes/oxidiertes Eisen
GSNO:	S - Nitrosogluthatione
GTN:	Glyceryltrinitrat
HEPES:	4-(2-Hydroxyethyl) -piperazin-1-
ethansulfonsäure	
HZV:	Herzzeitvolumen
ICD:	intrakardialer Defibrillator
iNOS:	induzierte NO-Synthase
IMBX:	Isobutyl-1-Methylxanthin
IS-5-MN:	Isosorbit – 5 - Mononitrat
Kap.	Kapitel
KCl:	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄ :	Kaliumhydrogenphosphat
L-NAME:	N ω -nitro-L-arginine methyl-ester
LVEDP:	linksventrikulärer enddiastolischer Druck
LVEDV:	linksventrikuläres enddiastolisches Volumen
MAP:	mittlerer arterieller Druck
MCT:	Monocrotalin
MgSO ₄ :	Magnesiumsulfat
mPAP:	mittlerer pulmonal arterielle Druck
NaCl:	Natriumchlorid
NCX:	Na ⁺ /Ca ²⁺ - Austauscher
NG:	Nitroglycerin
NO:	Stickstoffmonoxid
nNOS:	neuronale NO-Synthasen

NYHA:	New York Heart Association
O ₂ :	Sauerstoff
ODQ:	1H-oxadiazolo-quinooxalin-1-one
PAH:	pulmonal arterielle Hypertonie
PCWP:	Pulmonary Capillary Wedge Pressure, mittlerer pulmonal kapillärer Verschlußdruck
PDE-1A:	Phosphodiesterase 1A
PDE-5:	Phosphodiesterase 5
PFR:	frühdiaastolische Füllungsgeschwindigkeit
PKA:	Proteinkinase A
PKG:	Proteinkinase G
PLB:	Phospholamban
RAAS:	Renin-Angiotensin-Aldosteron System
RAP:	mittlerer rechtsatrialer Druck
ret v:	Relaxationsgeschwindigkeit
RIA:	Radioimmuno-Assay
Rp-8-CPT-cAMP:	8- (4- Chlorophenylthio) adenosine- 3', 5'- cyclic monophosphorothioate, Rp- isomer
SERCA:	sarkoplasmatische Ca ²⁺ -ATPase
sGC:	lösliche Guanylatzyklase
SIN-1 Chlorid:	3-Morpholinosydnominime
sin exp amp:	Relaxationsamplitude
sin exp tau:	Relaxationskoeffizient
SR:	Sarkoplasmatisches Retikulum
SV:	Schlagvolumen
SVR:	systemischer Gefäßwiderstand
Tab.:	Tabelle
PAP:	mittlerer pulmonal arterieller Druck
PCWP:	pulmonalkapillärer Verschlussdruck
pGC:	partielle Guanylatzyklase
PVR:	pulmonaler Gefäßwiderstand
T _e :	Relaxationskonstante

TG(mRen2)27

TnC:

TNF α :

TnI:

T to bl 10% peak:

VP:

Troponin C

Tumornekrosefaktor α

Troponin I

Zeit bis zu 10% der maximalen Zelllänge

Versuchspuffer

7.2 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Zürich, den 31.10.2014

7.3 Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. med. S. B. Felix und Herrn Dr. L. Herda für die Überlassung des Themas bedanken.

Zusätzlich möchte ich mich bei Dr. rer. nat. L. Eckerle und Dr. rer. nat. Y. Reinke für die ausserordentliche Unterstützung zum Fortführen meiner Arbeit bedanken.

Des Weiteren gilt meinem Dank den Medizinisch-Technischen Assistentinnen des Kardiologischen Forschungslabors, B. Püschel und S. Grugel, für die tatkräftige Unterstützung und tollen Arbeitsatmosphäre.

Nicht vergessen möchte ich auch Y. Keim und A. Fischer für die RIA Messungen.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und Freunden, vor allem meiner Mutter und meinen Brüdern Markus und Christian für die grosse Unterstützung während meines Studiums und meiner Promotion, für die stets aufbauenden Worte zur erfolgreichen Beendigung meiner Arbeit, bedanken. Meiner Nichte Annabelle und Neffen Arman, die während dieser Zeit zur Welt kamen, möchte ich mich für das herzerwärmende Lächeln in jeder Situation, bedanken.