

Aus dem Bereich Innere Medizin III, Kardiologie  
Der Medizinischen Fakultät  
Universität des Saarlandes, Homburg/ Saar  
Prof. Dr. med. Christoph Maack  
Direktor: Prof. Dr. med. Michael Böhm



**Bioenergetische Effekte von Levosimendan und Omecamtiv  
Mecarbil in Meerschweinchen-Kardiomyozyten**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät*

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2022

Vorgelegt von Daniela Pütz  
Geboren am 02.10.1993 in Frechen

# Dissertation Daniela Pütz

Tag der Promotion: 30.11.2022

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christoph Maack  
Prof. Dr. med. Michael Böhm

## Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis .....	5
Abbildungsverzeichnis .....	7
Abkürzungsverzeichnis .....	10
1 Zusammenfassung/ Abstract .....	14
1.1 Komparative bioenergetische Effekte von Levosimendan und Omecamtiv Mecarbil in Meerschweinchen-Kardiomyozyten .....	14
1.2 Comparative bioenergetic effects from Levosimendan and Omecamtiv Mecarbil in guinea-pig cardiac myocytes .....	15
2 Einleitung .....	18
2.1 Anatomie und Physiologie des Herzens .....	18
2.1.1 Übersicht Anatomie und Herzaktion .....	18
2.1.2 Die Elektromechanische Kopplung .....	20
2.1.3 Regulation der Pumpleistung .....	24
2.1.4 Mitochondriale Energetik .....	27
2.2 Herzinsuffizienz .....	31
2.2.1 Definition & Epidemiologie .....	31
2.2.2 Pathophysiologie .....	35
2.3 Therapie der Herzinsuffizienz .....	39
2.3.1 Inotropika – Übersicht .....	40
2.3.2 Levosimendan .....	43
2.3.3 Omecamtiv Mecarbil .....	49
2.4 Fragestellung der Arbeit .....	53
3 Material und Methoden .....	55
3.1 Material .....	55
3.1.1 Versuchstiere .....	55
3.1.2 Verwendete Materialien .....	55
3.2 Methoden .....	67
3.2.1 Myozytenisolation .....	67

3.2.2 Transfer der Myozyten auf das Deckglässchen/ Auf- und Einbau der Messkammer .....	70
3.2.3 Aufbau der Messanlage und Messablauf.....	71
3.2.4 Messprotokolle .....	76
3.2.5 Fluoreszenzfarbstoffe .....	81
3.2.6 Auswertung der Messergebnisse.....	84
4 Ergebnisse .....	88
4.1 Levosimendan: Experimente an isolierten Kardiomyozyten aus unbehandelten WT Meerschweinchen .....	88
4.2 Omecamtiv Mecarbil: Experimente an isolierten Kardiomyozyten aus unbehandelten WT Meerschweinchen .....	98
5 Diskussion .....	110
5.1 Levosimendan .....	113
5.2 Omecamtiv Mecarbil .....	117
5.3 Grenzen der Methoden.....	121
5.4 Fazit & Ausblick .....	121
6 Literaturverzeichnis .....	124
7 Publikationen.....	137
8 Danksagungen .....	137
9 Lebenslauf.....	138
10 Eidesstattliche Erklärung.....	139

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Wesentliche ätiologische Faktoren der Herzinsuffizienz (Framingham Heart Study).....	32
Tabelle 2: Definition der Herzinsuffizienz mit reduzierter (HFrEF), mäßiggradig eingeschränkter (HFmrEF) und erhaltener Ejektionsfraktion (HFpEF). .....	33
Tabelle 3: Inotropische Substanzen und deren Effektoromänen. ....	40
Tabelle 4: Molekulare Angriffspunkte, Wirkmechanismen, pharmakologische und klinische Effekte von Levosimendan und Omecamtiv Mecarbil. ....	48
Tabelle 5: NT-Tyrode Lösung (Ca <sup>2+</sup> frei).....	56
Tabelle 6: High K <sup>+</sup> -Tyrode Lösung .....	57
Tabelle 7: Spüllösung 1 Meerschwein .....	58
Tabelle 8: Verdauungslösung Meerschwein .....	58
Tabelle 9: Spüllösung 2 Meerschwein .....	59
Tabelle 10: DMEM .....	59
Tabelle 11: Lösungen bei der Zellmessung .....	61
Tabelle 12: Weitere Substanzen .....	62
Tabelle 13: Instrumentarium und Geräte zur Lösungsansetzung .....	62
Tabelle 14: Aufbau des Narkosesystems.....	63
Tabelle 15: Instrumentarium und Geräte zur Präparation und Isolation .....	64
Tabelle 16: Komponenten der Fluoreszenzmessanlage.....	64
Tabelle 17: Filter und Spiegel der Fluoreszenzmessanlage .....	66
Tabelle 18: Weitere Verbrauchsmaterialien der Zellmessung .....	66
Tabelle 19: Anregungs- und Emissionswellenlängen .....	71
Tabelle 20: Übersicht der Fluoreszenzniveaus bei Kalibrierung .....	75
Tabelle 21: Übersicht der allgemeinen Messprotokolle .....	77
Tabelle 22: Protokoll 2 Levo.....	77
Tabelle 23: Protokoll 1 Levo.....	78
Tabelle 24: Protokoll 3 Levo.....	78
Tabelle 25: Protokoll 4 Levo.....	79
Tabelle 26: Protokoll 2 OM.....	79
Tabelle 27: Protokoll 4 OM.....	80
Tabelle 28: Protokoll 5 OM.....	80
Tabelle 29: Protokoll 1 OM.....	80
Tabelle 30: Protokoll 3 OM.....	81
Tabelle 31: Protokoll 6 OM.....	81

Tabelle 32: Protokoll 7 OM.....	81
Tabelle 33: Übersicht der Kontraktilitätsauswertung.....	85
Tabelle 34: Überblick über neue therapeutische Methoden bei Herzinsuffizienz mit entsprechendem Wirkmechanismus und aktuellem klinischen Entwicklungsstadium. .....	123

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Lage des Herzens im Thorax mit Abgang der großen Gefäße. ....	18
Abbildung 2: Ansicht des Herzens von ventral und dorsal. ....	19
Abbildung 3: Erregungsbildungs- und Leitungssystem. ....	20
Abbildung 4: Elektromechanische Kopplung und mitochondriale Energetik; ....	21
Abbildung 5: Darstellung der Myofilamente ....	22
Abbildung 6: Feinbau des Myosin- und Aktinfilaments; ....	23
Abbildung 7: $\beta_1$ -AR-Stimulation einer Kardiomyozyte; ....	26
Abbildung 8: Atmungskette. Regulation der mitochondrialen ATP- und ROS- (Reaktive Sauerstoffspezies) Produktion in Kardiomyozyten; ....	27
Abbildung 9: Regulation der mitochondrialen Atmung und des Redoxstatus durch $\text{Ca}^{2+}$ und ADP; ....	29
Abbildung 10: Exazerbation Herzinsuffizienz. ....	34
Abbildung 11: Die physiologische Elektromechanische Kopplung und ihre Veränderung bei systolischer Herzinsuffizienz im Rahmen des kardialen Remodelings. ....	36
Abbildung 12: Parallele Aktivierung des mitochondriales Redoxgleichgewichts. ....	37
Abbildung 13: Molekulare Struktur von Levosimendan; ....	43
Abbildung 14: Schema zur Klasseneinteilung der $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitizer anhand des Wirkmechanismus. ....	44
Abbildung 15: Molekulare Struktur von Omecamtiv Mecarbil ( $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{FN}_5\text{O}_3$ ). ....	49
Abbildung 16: Wirkmechanismus und Effekte von Omecamtiv Mecarbil; ....	51
Abbildung 17: Schematische Übersicht der Langendorff-Isolationsanlage mit: ....	67
Abbildung 18: Meerschweinchenherz aufgehängt in der Langendorff-Perfusionsanlage ....	69
Abbildung 19: Schematischer Aufbau der IonOptix-Messanlage der Fluoreszenz- und Sarkomerlängenmessung; ....	72
Abbildung 20: Schematischer Aufbau zur PMT-Einstellung bei Fluoreszenzmessung von NAD(P)H/ FADH oder Indo/TMRM ( ....	73
Abbildung 21: Schematischer Aufbau des Lösungszulaufes, des Kammeranschlusses und der Absaugvorrichtung, mit: ....	74
Abbildung 22: Kalibrierung mit anschließender Hintergrundmessung am Beispiel einer IonWizard-Datei. Die obere Kurve stellt das NAD(P)H- und die unter das $\text{FADH}_2$ -Signal dar. ....	76
Abbildung 23: Vereinfachte Darstellung der Atmungskette. ....	82

Abbildung 24: Protokoll 1: Parameter der Zellverkürzung von Levo (n=29) und Zeitkontrolle (ZK) (n=28), sowie Redoxstatus von NAD(P)H/ NAD(P) <sup>+</sup> , FADH <sub>2</sub> / FAD und deren Verhältnis (Ratio) mit Levo (n=22) und ZK (n=26), über die Zeit (s);.....	89
Abbildung 25: Protokoll 2: Parameter der Zellverkürzung von Levo+Iso (n=35) und Iso (n=35), sowie Redoxstatus von NAD(P)H/ NAD(P) <sup>+</sup> , FADH <sub>2</sub> / FAD <sup>+</sup> und deren Verhältnis (Ratio) mit Levo+Iso (n=29) und Iso (n=27), über die Zeit (s); .....	91
Abbildung 26: Vergleich Levo-Gruppen aus Protokoll 1 und 2: Parameter der Zellverkürzung von Levo+Iso (n=35) und Levo (n=29), sowie Redoxstatus von NAD(P)H/NAD(P) <sup>+</sup> , FADH <sub>2</sub> /FAD <sup>+</sup> und deren Verhältnis (Ratio) von Levo+Iso (n=35) und Levo (n=29) über die Zeit (s);.....	93
Abbildung 27: Protokoll 3: Stressprotokoll. Parameter der Zellverkürzung von Levo+Iso (n=18) und Iso (n=19), sowie Redoxstatus von NAD(P)H/ NAD(P) <sup>+</sup> , FADH <sub>2</sub> / FAD <sup>+</sup> und deren Verhältnis (Ratio) mit Levo+Iso (n=18) und Iso (n=19) als Verlauf über die Zeit (s). Stimulationsfrequenz bei 0.3 Hz, bzw. 3 Hz (gelb unterlegter Bereich). .....	95
Abbildung 28: Protokoll 4: Stressprotokoll. Intrazelluläre Calciumkonzentration [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>c</sub> und mitochondriales Membranpotential ( $\Delta\Psi_m$ ) von Levo+Iso (n=14) und Iso (n=11) über die Zeit (s) (A/C), bzw. gegen die Sarkomerlänge ( $\mu\text{m}$ ) (B). Stimulationsfrequenz bei 0.3 Hz, bzw. 3 Hz (gelb unterlegter Bereich). .....	97
Abbildung 29: Protokoll 1-4: Systolische und diastolische Zellverkürzung; Redoxstatus von NAD(P)H/ NAD(P) <sup>+</sup> , FADH <sub>2</sub> / FAD <sup>+</sup> von 0 bis 1 $\mu\text{M}$ OM (n=17), von 0 bis 3 $\mu\text{M}$ OM (n=38), von 0 bis 10 $\mu\text{M}$ OM (n=17) und von 0 bis 30 $\mu\text{M}$ OM (n=5). .....	100
Abbildung 30: Systolische und diastolische Zellverkürzung von 0 bis 10 $\mu\text{M}$ OM (n=28) im Vergleich zur Zeitkontrolle (ZK) (n=35), sowie der Redoxstatus von NAD(P)H/ NAD(P) <sup>+</sup> , FADH <sub>2</sub> / FAD <sup>+</sup> von 0 bis 10 $\mu\text{M}$ OM (n=28) im Vergleich zu Zeitkontrolle (ZK) (n=35). .....	101
Abbildung 31: Zusammenfassung Protokolle 1-5; Parameter der Zellverkürzung von 0-30 $\mu\text{M}$ OM; .....	102
Abbildung 32: Zusammenfassung Protokolle 1-5: Kontraktionstransienten von kein (NT=Normale Tyrode) bis 30 $\mu\text{M}$ OM über 200 ms mit 0 $\mu\text{m}$ (n=119); 0.01/ 0.1 $\mu\text{M}$ (n=54); 1 $\mu\text{M}$ (n=92); 3 $\mu\text{M}$ (n=41); 10 $\mu\text{M}$ (n=20); 30 $\mu\text{M}$ (n=5); .....	104
Abbildung 33: Protokoll 6: Parameter der Zellverkürzung, Redoxstatus von NAD(P)H/ NAD(P) <sup>+</sup> , FADH <sub>2</sub> / FAD <sup>+</sup> und deren Verhältnis (Ratio) bei OM 1 $\mu\text{M}$ / 3 $\mu\text{M}$ von: OM+Iso 30 nM (n=14); OM+Iso 1 nM (n=36); nur OM (n=50) und Zeitkontrolle (ZK) (n=12) über die Zeit (s); .....	106

Abbildung 34: Protokoll 6: Arrhythmie-Score bei OM 1  $\mu\text{M}$  und 3  $\mu\text{M}$  von OM+Iso 30 nM (n=14); OM+Iso 1 nM (n=36); OM (n=50) und Zeitkontrolle (ZK) (n=12) über die Zeit (s); ..... 108

Abbildung 35: Protokoll 7: Intrazelluläre Calciumkonzentration  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  und mitochondriales Membranpotential ( $\Delta\Psi_m$ ) bei 1  $\mu\text{M}$  und 3  $\mu\text{M}$  OM von OM+Iso 30 nM (n=12); OM+Iso 1 nM (n=28); OM (n=36) und Zeitkontrolle (ZK) (n=10) über die Zeit (s); ..... 109

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
a.e.	Am ehesten
AM	Acetoxymethylester
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
AP	Aktionspotential
AR	Adrenorezeptor
$\beta$ -AR	Beta-Adrenorezeptor
BNP	Brain natriuretic peptide
Bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
°C	Grad Celsius
$\text{Ca}^{2+}$	Calcium
$[\text{Ca}^{2+}]$	Calciumkonzentration
CCD	Charge-coupled device; lichtempfindlicher Chip zur Datenspeicherung
CN	Zyanid
DD	Diastolische Dysfunktion
DWK	Dosis-Wirkungs-Kurve
$\emptyset$	Durchmesser
$\Delta\Psi_m$	Mitochondriales Membranpotential
$\Delta[\text{Ca}^{2+}]_c$	Intrazelluläre $\text{Ca}^{2+}$ Konzentrationsamplitude
DCLP	Dichroic long pass
Dias.	Diastolisch
DMSO	Dimethylsulfoxid
EF	Ejektionsfraktion
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ES	Extrasystole
Evtl.	Eventuell
EZ	Extrazellulär
$\text{FAD}^+$	Flavin-Adenin-Dinukleotid

FADH <sub>2</sub>	Reduzierte Form von FAD <sup>+</sup>
FCCP	Carbonylzyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon
FCS	Fetales Kalbsserum
FS	Fraktionierte Zellverkürzung
GSH	Glutathion
h	Stunde
HF	Herzfrequenz
HI	Herzinsuffizienz
HWZ	Halbwertszeit
Hz	Hertz ( $\frac{1}{s}$ )
HZV	Herzzeitvolumen
<i>I<sub>ca</sub></i>	Calciumeinstrom
I.d.R	In der Regel
IMM	Innere Mitochondrienmembran
IMS	Intermembranraum
Indo-1	Fluoreszenzfarbstoff und Calciumindikator
Insb.	Insbesondere
Iso	Isoprenalin
i.v.	Intravenös
IZ	Intrazellulär
K <sup>+</sup>	Kalium
λ	Wellenlänge
Levo	Levosimendan
[Levo]	Levosimendan-Konzentration
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
mNCE	Mitochondrialer Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> -Austauscher
ml, µl	Milliliter, Mikroliter
MCU	Mitochondrialer Calcium Uniporter
MG	Molekulargewicht
min	Minute
mol, mmol, µmol, nmol	Mol, Millimol, Mikromol, Nanomol
MnSOD	Mangansuperoxiddismutase
n	Anzahl der Experimente (bzw. Anzahl der Zellen)
Na <sup>+</sup>	Natrium
NaCl	Natriumchlorid

NAD <sup>+</sup>	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-phosphat
NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-H <sup>+</sup> H <sup>+</sup>
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-phosphat-H <sup>+</sup> H <sup>+</sup>
NCX	Natrium-Calcium-Austauscher in der Zellmembran
[Na <sup>+</sup> ] <sub>i</sub>	Zytosolische Natriumkonzentration
Nnt	Nicotinamid-Nukleotid-Transhydrogenase
n.s.	Nicht signifikant
NT	Normale Tyrode
NT-proBNP	N-terminales pro B-Typ natriuretisches Peptid
o.a.	Oder auch
o.g.	Oben genannt
OM	Omecamtiv Mecarbil
[OM]	Omecamtiv Mecarbil-Konzentration
·O <sub>2</sub>	Superoxidradikal
p	P-Wert, Signifikanzwert
pc	Polychroisch
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PIE	Positiv inotroper Effekt
PLB	Phospholamban
PMT	Photomultiplier
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Relaxationszeit
s.	Siehe
s, ms	Sekunde, Millisekunde
s.c.	Subkutan
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SET	Systolische Ejektionszeit
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
SERCA	SR-Ca <sup>2+</sup> -ATPase
sog.	Sogenannt
SV	Schlagvolumen
SVR	Systemischer Gefäßwiderstand
Sys.	Systolisch

TMRM <sup>+</sup>	Tetramethylrhodamin-methylester
TnC	Troponin C
TnI	Troponin I
TnT	Troponin T
U/min	Umdrehungen pro Minute
vs.	Versus
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp
z.B.	Zum Beispiel
Z.n.	Zustand nach
[...]	... Konzentration
[...] <sub>c</sub>	Intrazelluläre ... Konzentration

## 1 Zusammenfassung/ Abstract

### 1.1 Komparative bioenergetische Effekte von Levosimendan und Omecamtiv Mecarbil in Meerschweinchen-Kardiomyozyten

**Hintergrund:** Der kardiogene Schock ist ein ungelöstes medizinisches Problem. Positiv inotrope Medikamente (insb. Katecholamine) erhöhen die Mortalität bei Patienten mit akuter Herzinsuffizienz. Zugrunde liegen v.a. proarrhythmische Effekte und erhöhter Sauerstoffverbrauch. Levosimendan war ursprünglich als  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitizer der Klasse II (s. 2.3.4 *Levosimendan*) kategorisiert, der die Kontraktionskraft ohne Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, mit marginaler Phosphodiesterasen 3 (PDE3)-Inhibition, verstärkt. Andere Quellen sehen die PDE3-Inhibition als tragenden Mechanismus, was bei akuter Herzinsuffizienz eine negative Eigenschaft ist, da es über den  $\beta$ -adrenergen Signalweg pro-hypertrophe, pro-apoptotische und pro-arrhythmische Effekte wie z.B. Adrenalin induziert. Im Gegensatz dazu verstärkt Omecamtiv Mecarbil, ein Myosinaktivator, die kardiale Pumpfunktion von Hunden mit Herzinsuffizienz, ohne den Sauerstoffbedarf zu erhöhen. In Menschen verbessert Omecamtiv Mecarbil das Herzzeitvolumen und neigt dazu, die Symptome bei akuter Herzinsuffizienz abzuschwächen. In früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe zeigte der pure  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitizer EMD-57033, dass durch die Erhöhung der Calcium-Affinität der Myofilamente die systolische Kontraktionskraft erhöht wird, allerdings der mitochondriale Redoxstatus von NAD(P)H und  $\text{FADH}_2$  oxidiert wird, sowie die Emission von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) erhöht wird. In der vorliegenden Arbeit werden die bioenergetischen Eigenschaften von Levo im Vergleich mit OM in Meerschweinchen-Kardiomyozyten evaluiert.

**Methoden und Ergebnisse:** In vorausgehenden Untersuchungen an Maus-Kardiomyozyten wurde festgestellt, dass der pure  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitizer EMD-57033 die systolische Sarkomerverkürzung auf Kosten der diastolischen Länge verstärkt. Dies war assoziiert mit einer Oxidation des Redoxstatus von NAD(P)H und FAD, was mit einem Ungleichgewicht zwischen ADP-induzierter Oxidation und Calcium-vermittelter Reduktion und daraus folgender Erhöhung der mitochondrialen ROS-Emission zu erklären ist. In dieser Versuchsreihe wurden Kardiomyozyten aus Meerschweinchen isoliert und einer Feldstimulation von 1 Hz bei 37 °C ausgesetzt. Bei alleiniger Applikation hatte Levosimendan (bis zu 10  $\mu\text{M}$ ) nur einen geringen Effekt auf die systolische Sarkomerverkürzung, die diastolische Spannung und den NAD(P)H/FAD

Redoxstatus. Die Präinkubation der Kardiomyozyten mit dem  $\beta$ -adrenergen Agonisten Isoprenalin (in einer 1 nM Konzentration), die allein keinen Effekt auf die Sarkomerverkürzung hatte, erhöhte die Potenz und Effektivität des Effektes von Levosimendan auf die Sarkomerverkürzung. Der Redoxstatus von NADH(P)H und FAD wurde hierbei nicht beeinflusst.

Omecamtiv Mecarbil verlängerte konzentrationsabhängig (0.01-30  $\mu$ M) die Zeit zur maximalen Zellverkürzung. Dies ging einher mit einer Erhöhung der diastolischen Spannung bei Verstärkung der systolischen Sarkomerverkürzung (Optimum bei 3  $\mu$ M). Im Gegensatz zu mit Levosimendan behandelten Kardiomyozyten, ließ sich die diastolische Dysfunktion nicht durch Isoprenalin verbessern. Es zeigten sich bei Kombination von OM [1  $\mu$ M] oder [3  $\mu$ M] mit Isoprenalin in > 50 % der Fälle zelluläre Arrhythmien. Trotz Erhöhung der diastolischen Spannung verlief der Redoxstatus von NAD(P)H/ FAD stabil.

**Zusammenfassung:** Die Steigerung der Sarkomerverkürzung durch Levosimendan in der Gegenwart einer geringen  $\beta$ -adrenergen Stimulation ist am ehesten durch eine PDE3-Inhibition zu erklären, während der  $\text{Ca}^{2+}$ -sensibilisierende Effekt in der Abwesenheit von  $\beta$ -adrenerger Stimulation gering ausgeprägt ist. Omecamtiv Mecarbil induziert neben der erwünschten Verlängerung der systolischen Sarkomerverkürzung eine Erhöhung der diastolischen Spannung. Kombiniert man Omecamtiv Mecarbil mit  $\beta$ -adrenerger Stimulation, zeigen sich proarrhythmische Effekte. Diese Daten könnten den gelegentlichen Troponinanstieg bei Patienten während der Behandlung mit Omecamtiv Mecarbil erklären, unabhängig vom vermuteten, negativen Einfluss auf die Koronarperfusion. Zusammenfassend lassen sich Levosimendan unerwünschte Wirkungen wie proarrhythmische Effekte zuordnen, die durch die Folgen der Aktivierung des  $\beta$ -adrenergen Signalwegs resultieren. Omecamtiv Mecarbil verbessert innerhalb der therapeutischen Breite die systolische Funktion und stellt ein vielversprechendes Präparat zur Behandlung der Herzinsuffizienz dar. Bei höherer Dosierung induziert Omecamtiv Mecarbil eine diastolische Dysfunktion mit gegenteiligen Effekten.

## 1.2 Comparative bioenergetic effects from Levosimendan and Omecamtiv Mecarbil in guinea-pig cardiac myocytes

**Background:** Cardiogenic shock is an unmet clinical need, since current inotropic drugs (e.g., catecholamines) increase mortality in patients with acute heart failure. As underlying reasons, pro-arrhythmic effects and elevated oxygen consumption of catecholamines have been put forward. Levosimendan (was originally considered a calcium-sensitizer class II that elevates contractile force without increasing intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  and a minor effect on the phosphodiesterases (PDE3s), while other reports suggested that Levosimendan inhibits mainly PDE3s, a property deemed adverse in heart failure. In contrast, Omecamtiv Mecarbil is a myosin activator that prolongs cardiac contraction without elevating oxygen consumption in dogs with heart failure. We have recently discovered that increasing  $\text{Ca}^{2+}$  affinity of myofilaments with a pure Ca-sensitizer increased systolic force development but oxidized mitochondrial NAD(P)H and FADH and increased the emission of reactive oxygen species. Here, we evaluated the bioenergetic (redox) properties of Levosimendan and Omecamtiv Mecarbil in guinea-pig cardiac myocytes.

**Methods and results:** In earlier experiments of the working group on isolated murine cardiac myocytes, the pure calcium-sensitizer EMD-57033 increased systolic shortening, but at the cost of an increase in diastolic sarcomere length. This was associated with an oxidation of the redox states of NAD(P)H and FAD, which could be explained by a mismatch between sarcomere-induced oxidation and  $\text{Ca}^{2+}$ -induced reduction of NAD(P)H/FAD redox states, elevating mitochondrial ROS emission.

In the present work, cardiac myocytes were isolated from guinea pig hearts and field-stimulated at 1 Hz and 37 °C. Levosimendan (up to 10  $\mu\text{M}$ ) had overall minimal effects on sarcomere shortening, diastolic tension and NAD(P)H/ FAD redox states. However, the concentration-dependent increase of sarcomere shortening was shifted to the left (increased potency) and its maximal effect became potentiated (increased efficacy) by pre-incubation of cardiac myocytes with a sub-threshold concentration of isoproterenol (1 nM). Under all conditions, the redox states of NAD(P)H and FAD remained stable in response to Levosimendan (with or without isoproterenol). Omecamtiv Mecarbil substantially prolonged the time to peak of cell shortening in a concentration-dependent manner (0.01-30  $\mu\text{M}$ ). This was associated with an increase in diastolic tension but and increases in systolic sarcomere shortening (optimum at 3  $\mu\text{M}$ ). In contrast, isoproterenol did not ameliorate diastolic dysfunction in Omecamtiv Mecarbil-treated myocytes, but provoked arrhythmias in >50% of cases when combined with 1 or 3  $\mu\text{M}$  Omecamtiv Mecarbil. Despite the substantial increase in diastolic tension, the

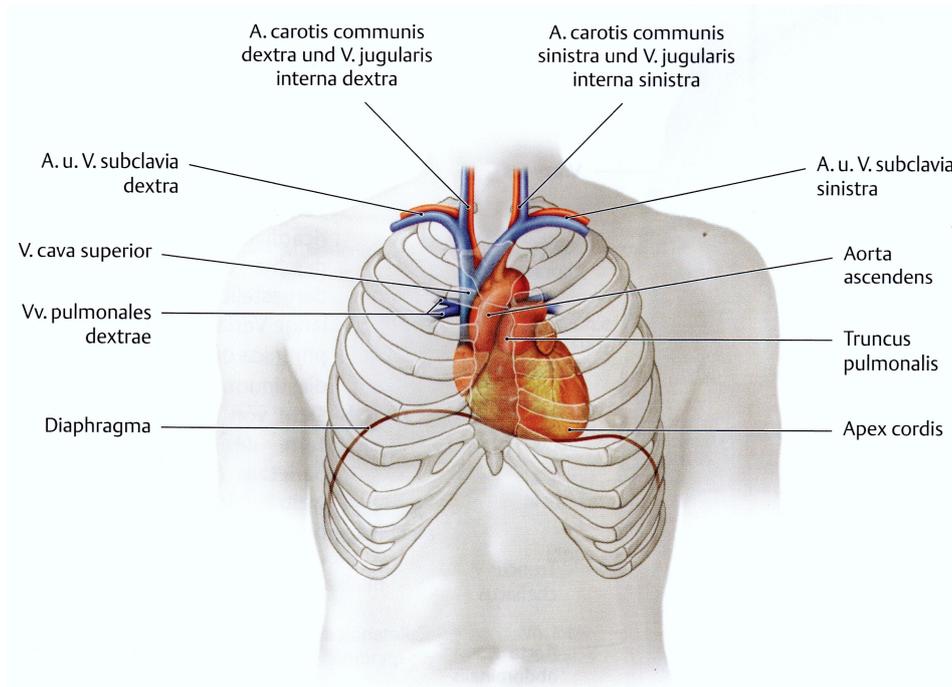
redox states of NAD(P)H/ FAD remained stable, in agreement with the previously reported unchanged oxygen consumption.

**Conclusions:** Levosimendan does not behave as a calcium-sensitizer, but rather as a PDE3-inhibitor, since its stimulating effect on sarcomere shortening becomes apparent only after beta-adrenergic prestimulation. In contrast, Omecamtiv Mecarbil induces diastolic dysfunction rather than increasing sarcomere shortening, however, the prolongation of systolic sarcomere shortening came at no elevated oxygen demand. Combining Omecamtiv Mecarbil with  $\beta$ -adrenergic stimulation was pro-arrhythmic. These data may explain occasional increases in troponin in patients treated with Omecamtiv Mecarbil independent of the so far suspected negative impact on coronary perfusion. Together, while the PDE3-inhibiting effects of Levosimendan may predispose to arrhythmias, Omecamtiv Mecarbil may induce diastolic dysfunction at concentrations that reasonably affect systolic sarcomere shortening.

## 2 Einleitung

### 2.1 Anatomie und Physiologie des Herzens

#### 2.1.1 Übersicht Anatomie und Herzaktion

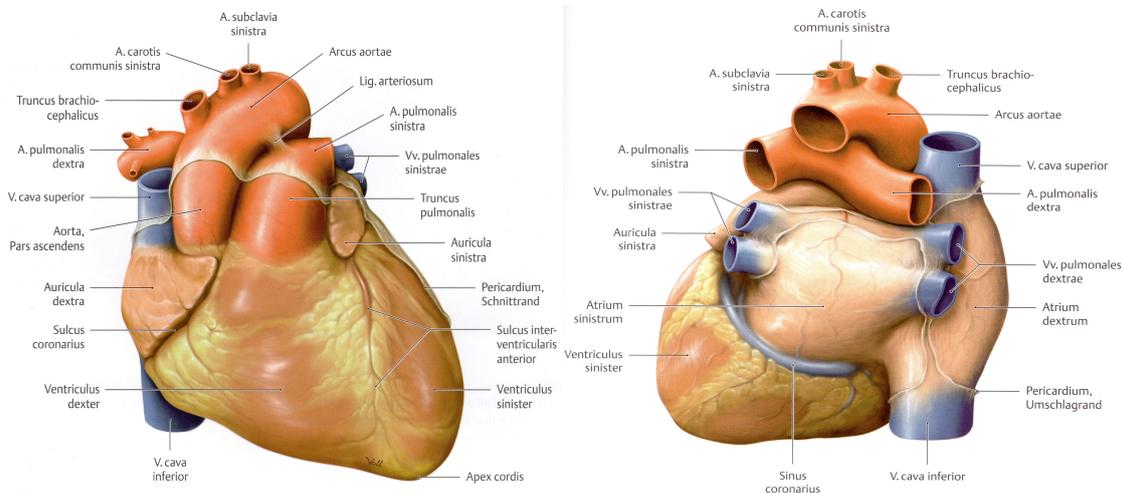


**Abbildung 1: Lage des Herzens im Thorax mit Abgang der großen Gefäße.**

(SCHÜNKE et al., 2015)

Das Herz (lateinisch, Cor; griechisch, Kardia) ist ein muskuläres Hohlorgan und liegt im Thorax des Menschen. Es ist kaudal durch das Zwerchfell, lateral durch die Lungen, ventral durch das Sternum und dorsal durch die Wirbelsäule begrenzt. Histologisch folgt der Aufbau der Wandschichten von innen nach außen aus Endokard, Myokard und Epikard; umgeben wird es zusätzlich vom Perikard, das als Gleit- und Schutzschicht dient. Aufgebaut aus 2 Vorhöfen und 2 Ventrikeln verbindet es funktionell den großen Körper- und den kleinen Lungenkreislauf. Die Pumpleistung des linken und rechten Herzens ist im Idealfall identisch; das linke Herz pumpt das sauerstoffreiche Blut in die Aorta, von dort aus in die Peripherie und die Kapillargebiete, bis das sauerstoffarme Blut über die Hohlvenen das rechte Herz erreicht. Von dort aus gelangt es über die Pulmonalarterie in die Lungen, wo es zur

Abgabe von Kohlendioxid und zur Aufbereitung mit Sauerstoff kommt. Die Herzklappen agieren als Ventile und erlauben den Blutfluss nur in eine Richtung (PAPE et al., 2014).



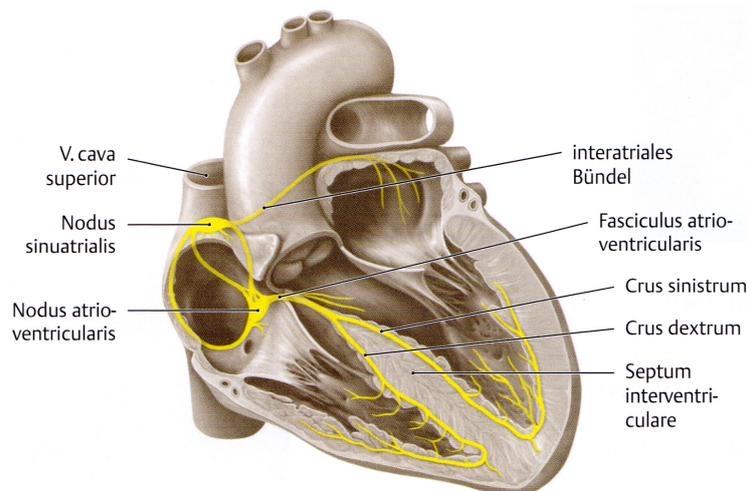
**Abbildung 2: Ansicht des Herzens von ventral und dorsal.**

(SCHÜNKE et al., 2015)

Um die Pumpleistung des Herzens aufrecht zu erhalten, sind folgende Größen entscheidend: Das Myokard selbst mit Kontraktion und Relaxation, das Endokard und die Herzklappen für die verschiedenen Phasen der Herzaktion (s.u.), das Koronargefäßbett zur regelrechten Versorgung des Myokards und das Erregungsbildungs- und Leitungssystem zur rhythmischen Kontraktion und Relaxation der Myokardareale (PAPE et al., 2014).

Die Herzaktion selbst kann in vier Abschnitte unterteilt werden. Die Anspannungs- und Austreibungsphase werden als Systole und die Erschlaffungs- und Füllungsphase als Diastole bezeichnet. Beginnend mit der isovolumetrischen Anspannungsphase, in welcher der intraventrikuläre Druck stetig zunimmt, den intraortalen/ intrapulmonalarteriellen Druck allerdings nicht überschreitet und alle Klappen verschlossen sind. Dem folgt die auxotone Austreibungsphase der Ventrikel, sobald der Druck im Ventrikel größer als in der Aorta bzw. Pulmonalarterie wird. Gleichzeitig läuft der sogenannte Ventilebenenmechanismus für die frühdiastolische Füllung ab. Dies bedeutet, dass das Blut aus der Hohlvene durch Absenkung der Ventilebene bei der Austreibung von oxygeniertem Blut in die Aorta angesaugt wird. Die Taschenklappen sind in dieser Phase geöffnet.

Nach Austreibung des Blutes schließt sich die isovolumetrische Erschlaffungsphase mit vollständiger Relaxation des Kammermyokards und intraventrikulärem Druckabfall an. Erneut werden die Klappen vollständig geschlossen. In der letzten Phase der Herzaktion findet die erneute Füllung der Kammern statt. Die Druckdifferenz zwischen Vorhof und Ventrikel, mit Kontraktion der Vorhöfe am Ende der Diastole, ermöglicht das Öffnen der Segelklappen und somit den freien Blutstrom in die Ventrikel (PAPE et al., 2014).



**Abbildung 3: Erregungsbildungs- und Leitungssystem.**

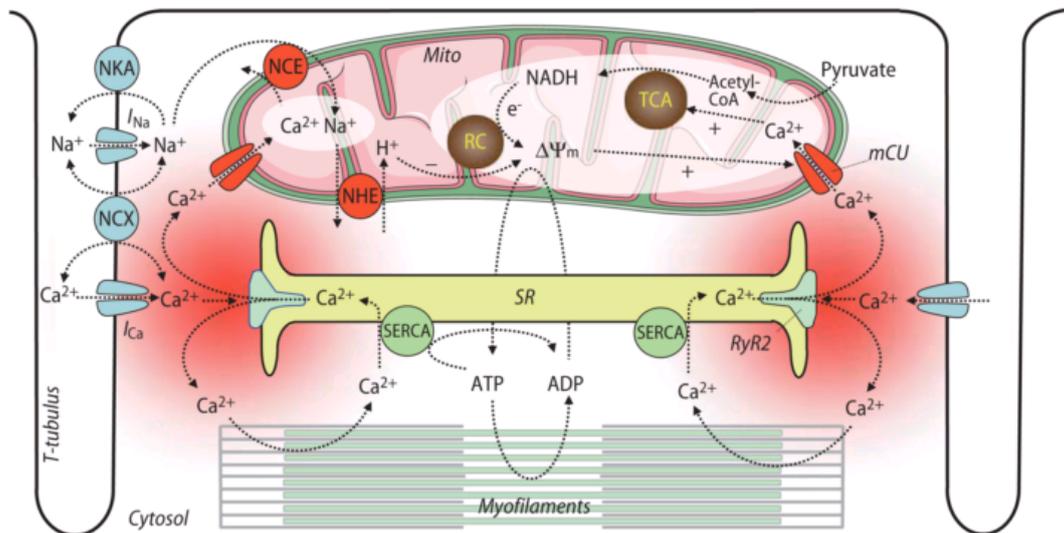
(SCHÜNKE et al., 2015)

Damit die oben beschriebenen Phasen koordiniert ablaufen können, benötigt das Herz eine elektrische Stimulation. Ausgehend vom Sinusknoten breitet sich die Erregung des Herzens über das Vorhofmyokard und den Atrioventrikular (AV)-Knoten auf das His-Bündel, die Tawara-Schenkel, die Purkinje-Fasern und das Kammermyokard aus, von wo aus die Erregung von einer Kardiomyozyte über Gap-Junctions, eine Art Verbindungskanal, auf die nächste Zelle übertragen wird. Die Kardiomyozyten werden aus diesem Grund auch als funktionelles Synzytium beschrieben.

### **2.1.2 Die Elektromechanische Kopplung**

Die Erregung einer Kardiomyozyte ist ein elektrisches Phänomen, welches sich an der Zellmembran in Form eines Aktionspotentials (AP) abspielt. Der Prozess vom Eintreffen eines APs an der Zellmembran, bis hin zur Kontraktion der Myofilamente wird als elektromechanische Kopplung (EM-Kopplung/ EC-Coupling) bezeichnet

(MAACK, O'ROURKE, 2007). Bei Beginn eines APs öffnen sich spannungsabhängige  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Kanäle und im Verlauf der Membrandepolarisation auch L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, durch deren  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  von etwa  $0.1 \mu\text{mol/L}$  auf maximal  $1-10 \mu\text{mol/L}$  ansteigt (TIBBITS, HAMMAN, 1991).



**Abbildung 4: Elektromechanische Kopplung und mitochondriale Energetik;**

TCA Citratzyklus; RC Atmungskette;  $\Delta\Psi_m$  mitochondriales Membranpotential; NCE Mitochondrialer  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher; NHE Mitochondrialer  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher; NKA  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase im Sarkolemm; NCX  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher. (MAACK, O'ROURKE, 2007)

Das einströmende  $\text{Ca}^{2+}$  triggert am Ryanodin-Rezeptor 2 (RyR2) des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) eine zusätzliche, deutlich höhere Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen (sog.  $\text{Ca}^{2+}$  induzierte  $\text{Ca}^{2+}$  Freisetzung) (HAIN et al., 1995; SONG et al., 2001). Diese führt nicht nur durch Bindung an Troponin C (TnC) zur Kontraktion der Myofilamente, sondern auch zur Aufnahme in Mitochondrien, wo  $\text{Ca}^{2+}$  den Citratzyklus stimuliert (Abbildung 4). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in unmittelbarer Nähe des SR und der Mitochondrien erreicht Werte von bis zu  $10 \mu\text{mol/L}$  -  $7 \text{mmol/L}$ , wobei im übrigen Zytosol durch Diffusion nur  $0.5 \mu\text{mol/L}$  -  $1.5 \mu\text{mol/L}$  erreicht werden. Die hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen im Bereich einer Calcium-Mikrodomäne an der mitochondrialen Membran sind nötig, um die ausreichende Aufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  über den mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Uniporter (MCU) ins Mitochondrium zu gewährleisten, da dessen  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität im mikro- bis millimolaren Bereich liegt. Die benötigte Energie für die Kontraktion wird über oxidative Phosphorylierung (s. 2.1.4 Mitochondriale Energetik)

an der inneren Mitochondrienmembran (IMM) zur Verfügung gestellt, welche vor allem durch ADP,  $P_i$  und  $Ca^{2+}$  reguliert wird (MAACK, O'ROURKE, 2007).

Die Myofilamente, aufgebaut aus Aktin-, Myosin- und Titinfilamenten, sind in Abbildung 5 und Abbildung 6 dargestellt. Sie bilden den kontraktilem Apparat und die mikroskopisch zu erkennende Querstreifung der Kardiomyozyten. Die Eigenlänge der Myofilamente verändert sich bei Kontraktion oder Dehnung nicht, sie gleiten teleskopartig übereinander (Gleitfilamenttheorie).

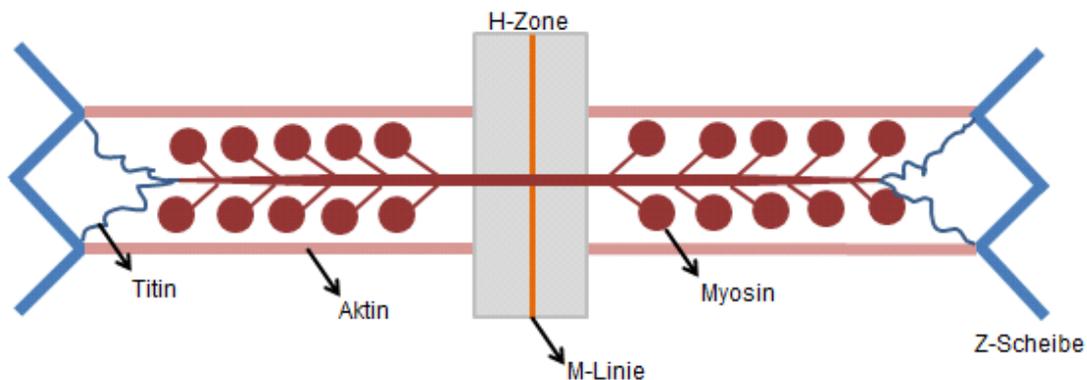


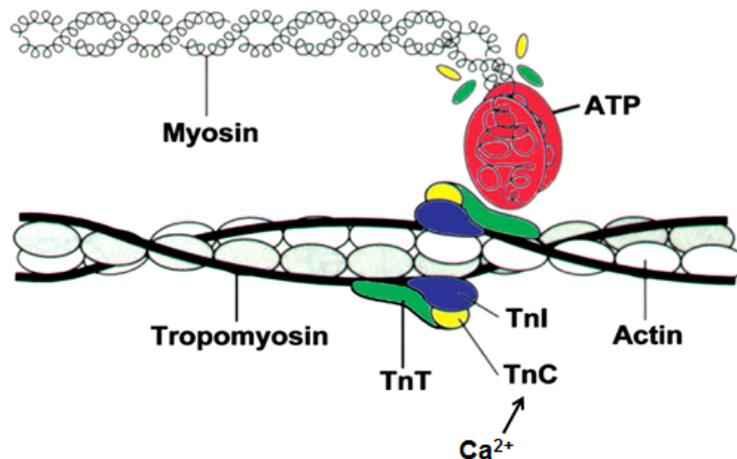
Abbildung 5: Darstellung der Myofilamente

Die zyklischen Wechselwirkungen der Kontraktion werden als sogenannter Querbrückenzyklus bezeichnet, welcher im Folgenden näher erläutert wird:

1. Anlagerung von ATP an den Myosinkopf und daraufhin Lösung der hochaffinen Bindung von Myosinkopf und Aktin
2. Hydrolyse von ATP in ADP+ $P_i$
3. Niederaffine Anlagerung des Myosinkopfes an Aktin
4. Hochaffine Anlagerung des Myosinkopfes an Aktin durch Strukturumlagerung im Myosinkopf
5. Kippen des Hebelarms durch Phosphatabdissoziation, Verschiebung der Filamente um etwa 6-8 nm; erster Teil des Kraftschlags
6. Weiteres Kippen des Hebelarms unter ADP-Abgabe; Ineinanderschieben von 2-4nm; Zweiter Teil des Kraftschlages

(BEHRENDIS et al., 2017)

Im physiologischen Zustand bindet ein neues ATP Molekül sehr schnell ( $<1$  ms) an das aktive Zentrum des Myosinkopfes. Bei mehrfachem Durchlaufen des Querbrückenzyklus, verschiebt sich das Myosin teleskopartig gegen Aktin und der Muskel verkürzt sich.



**Abbildung 6: Feinbau des Myosin- und Aktinfilaments;**

Verdeckte Bindungsstelle für Myosinköpfchen durch Tropomyosin, Troponin 1 (Tn1), Troponin C (TnC) und Troponin T (TnT). (HASENFUSS, TEERLINK, 2011)

Bevor ein Querbrückenzyklus ablaufen kann, muss zunächst die durch die Regulatorproteine Tropomyosin, Troponin C (TnC), Troponin I (TnI) und Troponin T (TnT) bedeckte, hochaffine Bindungsstelle der Myosinköpfe auf dem Aktinfilament freigegeben werden (Abbildung 6). Kardiales TnC hat drei  $Ca^{2+}$ -Bindungsstellen, von denen im relaxierten Zustand zwei besetzt sind. Bei Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration über 100 nmol/L kann ein drittes  $Ca^{2+}$ -Ion an die freie Stelle binden und erwirkt somit eine Umlagerung des Tropomyosins, wodurch die Aktin-/Myosinbindungsstelle freigegeben wird (BEHRENDTS et al., 2017). Zusätzlich stellt das sogenannte kardiale Myosin-bindende Protein C (cMyBP-C) eine weitere Verbindung zwischen Aktin- und Myosinfilamenten her. Das Protein spielt eine wichtige Rolle in der Stabilisierung der dicken Filamente, der Bereitstellung ausreichender Myosinköpfe für den benötigten Bedarf und der Reduktion der Aktinomyosin ATPase-Aktivität (FLASHMAN et al., 2004).

Das kardiale TnI hat zudem eine Untereinheit, die durch cAMP-abhängige Proteinkinasen phosphoryliert wird, was den Ansatzpunkt von  $Ca^{2+}$ -Sensitizern und Desensitizern darstellt (HASENFUSS, TEERLINK, 2011) (s. 2.3.1 *Inotropika* –

*Übersicht*). Die Phosphorylierung von TnI durch Katecholamine führt zu einer beschleunigten Dissoziation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen von TnC (ENDO, 1995). Die Folgen sind eine schnellere Relaxation des Herzmuskels, allerdings auch eine erst bei höheren  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen zu erreichende halbmaximale Kraftentwicklung. Veränderungen in der myofibrillären  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensibilität spielen eine wichtige Rolle beim Ansprechen intakter Herzmuskelzellen auf inotrope Stimulation (BLINKS, ENDO, 1986). Die myofilamentäre  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensibilisierung liegt auch dem Frank-Starling-Mechanismus zugrunde (s.u.). Der Herzmuskel relaxiert, wenn die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wieder absinkt. Zum einen geschieht dies über die sog. SERCA-Pumpe (Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase), die die Ionen unter ATP Verbrauch wieder in das SR pumpt, zum anderen über den sarkolemmalen  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) sowie eine  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase im Sarkolemm (Abbildung 4).

### **2.1.3 Regulation der Pumpleistung**

Zur Anpassung an den jeweiligen Bedarf des Körpers muss sich der Blutfluss verändern können. Das sog. Herzzeitvolumen (HZV) ist dabei ein Index für die kardiale Leistung. Es wird aus dem Produkt der Herzfrequenz (HF) und dem Schlagvolumen (SV) bestimmt. In Ruhe beträgt es beim Erwachsenen durchschnittlich 4.5-6 L/Min. und kann bei Belastung auf 25 L/Min, bei Leistungssportlern auf bis zu 35 L/Min ansteigen. Die dynamische Anpassung des HZV an körperliche Belastung erfolgt über die Änderung der HF oder des SV. Das SV wird über drei Mechanismen gesteigert; 1. Erhöhung des Sympathikustonus, 2. den Frank-Starling-Mechanismus und 3. durch die positive Kraft-/ Frequenz-Beziehung (Bowditch-Treppe) (MULIERI et al., 1992; PAPE et al., 2014).

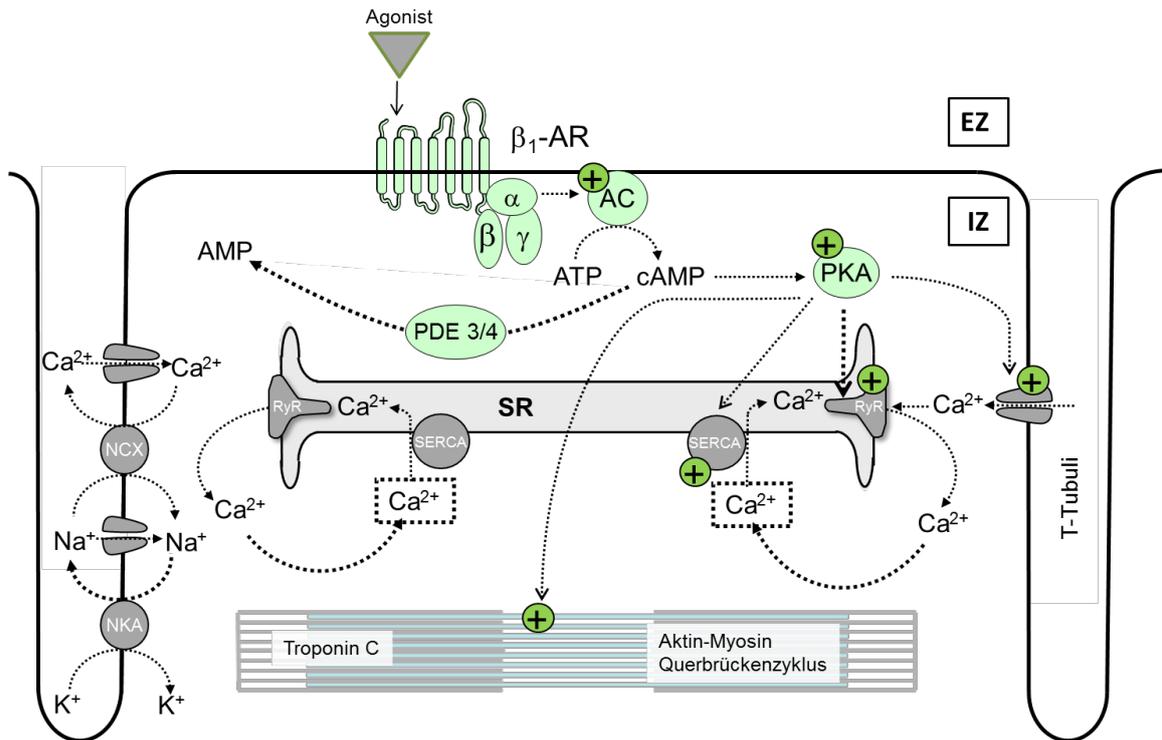
#### **2.1.3.1 Sympathikus**

Bei Steigerung der körperlichen oder emotionalen Belastung, wie z.B. beim Sprint, bei Furcht, Aufregung, Krankheit etc., werden aus der Nebenniere Katecholamine, wie Adrenalin und Noradrenalin freigesetzt. Neben zahlreichen Effekten auf Skelettmuskulatur, Gastrointestinaltrakt, Bronchialbaum, Gefäße, etc. induzieren die Neurotransmitter bei agonistischer Bindung an den  $\beta_1$ -Adrenozeptor (AR) der Kardiomyozyten eine positiv inotrope (Steigerung der Kontraktionskraft) und eine positiv lusitrope Wirkung (Steigerung der Relaxationsgeschwindigkeit). Des Weiteren

erfolgt eine schnellere diastolische Depolarisation am Sinusknoten (positiv chronotrop) und eine schnellere Überleitung der Erregung vom Vorhof- auf das Ventrikelmyokard im AV-Knoten (positiv dromotrop).

Nach Binden am  $\beta_1$ -AR wird die an die Zellmembran gebundene Adenylatzyklase (AC) über Kopplung des Rezeptors an stimulatorische G-Proteine ( $G_s$ ) aktiviert, die ATP zu cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) konvertieren (Abbildung 7). Die Phosphodiesterasen (PDE) bauen cAMP zu AMP und cGMP zu GMP ab. Es existieren 4 Isoformen (1-4), wobei v.a. PDE3 und -4 ventrikulär exprimiert sind (REEVES et al., 1987). Die humanen PDE3 und -4 haben, im Vergleich zu den Äquivalenten der Meerschweinchen, ähnliche kinetische Profile. Die beiden Enzyme dominieren in linksventrikulärem Myokard andere PDE. Von den verschiedenen PDE Isoenzymen 1, 2, 3 und 4 des menschlichen Myokards, wird die PDE3 als Mediator des positiv inotropen Effekts (PIE) beschrieben. (REEVES et al., 1987; RAASMAJA et al., 1991; KATANO, ENDOH, 1992).

Das cAMP dient als Second Messenger und bindet an eine Untereinheit der Proteinkinase A (PKA). Das nach Verschmelzung der Untereinheiten nun aktive Enzym phosphoryliert neben einigen metabolischen Enzymen und Ionenkanälen den L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanal und erhöht so dessen Öffnungswahrscheinlichkeit (YUE et al., 1990). Der dadurch erhöhte  $Ca^{2+}$ -Einstrom triggert die  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR, was wiederum vermehrt an TnC binden kann. Pro Kontraktion werden mehr und schneller Aktin-Myosin-Bindungen rekrutiert (pos. inotrop). Bei Phosphorylierung des cMyBP durch cAMP-abhängige Proteinkinasen wird der Effekt auf die ATPase aufgehoben und der Querbrückenzyklus zusätzlich enthemmt (FLASHMAN et al., 2004). Phospholamban agiert als Inhibitor der SERCA-Pumpe. Wird dieses durch die PKA und andere cAMP-abhängige Proteinkinasen phosphoryliert und damit inaktiviert, wird die Leistung der Pumpe verstärkt. Die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration fällt schneller ab und  $Ca^{2+}$  kann beschleunigt von TnC abdiffundieren (pos. lusitrop) (Abbildung 7) (HASENFUSS et al., 1994b). Dies hat einen  $Ca^{2+}$ -desensibilisierenden Effekt auf Tnl. Bei niedrigerem pH-Wert läuft dieser Prozess verstärkt ab, was bei Rückschluss auf die Klinik bei Patienten im Schockzustand mit verändertem pH-Wert eine wichtige Bedeutung hat (WESTFALL et al., 2001).



**Abbildung 7:  $\beta_1$ -AR-Stimulation einer Kardiomyozyte;**

AC, Adenylatzyklase; PKA, Proteinkinase A; PDE, Phosphodiesterase; cAMP, zyklisches Adenosinmonophosphat; EZ, Extrazellulär; IZ, Intrazellulär. Verändert nach (MAACK et al., 2018).

Durch  $\beta_1$ -adrenerge Stimulation wird der Bedarf an ATP gesteigert, welches durch oxidative Phosphorylierung unter Verbrauch von  $O_2$  an der Atmungskette regeneriert werden muss.  $Ca^{2+}$  trägt zur Anpassung der ATP-Produktion an den gesteigerten Bedarf bei, indem es vermehrt in Mitochondrien aufgenommen wird, wo es den Citratzyklus stimuliert, um die Regeneration von NADH und  $FADH_2$  für die Abgabe von Elektronen an die Atmungskette zu ermöglichen. Dies wird als parallele Aktivierung bezeichnet (PAPE et al., 2014; MAACK et al., 2017).

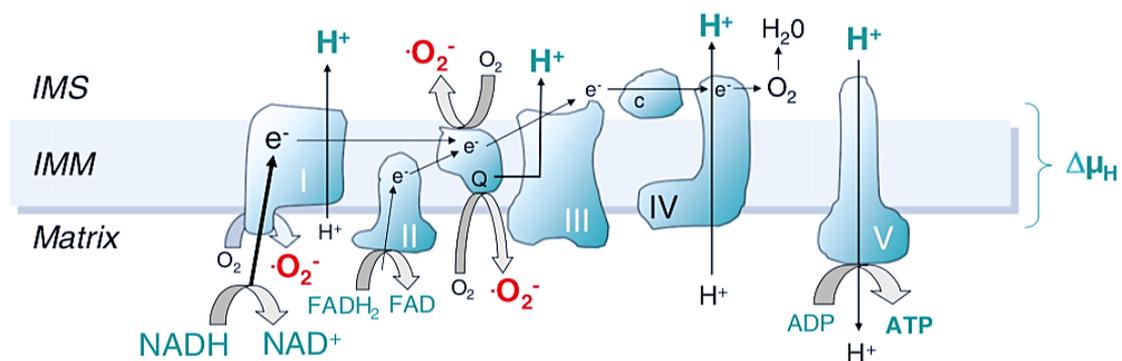
### 2.1.3.2 Frank-Starling-Mechanismus

Der zweite Mechanismus zur Steigerung der kardialen Leistung wird als Frank-Starling-Mechanismus bezeichnet. Je größer das Blutvolumen, das während der Diastole in die Ventrikel strömt, desto größer das systolische Auswurfvolumen. Eine Vordehnungszunahme (Vorlast) zieht, innerhalb bestimmter Grenzen, eine Zunahme der Kontraktionsamplitude nach sich. Dies steht in Zusammenhang mit dem enddiastolischen Druck des linken und rechten Ventrikels. Zellulär ist dieser Effekt

anhand veränderter Überlappung der Aktin- und Myosinfilamente und deren dehnungsabhängiger Empfindlichkeitsänderung gegenüber  $\text{Ca}^{2+}$  festzustellen. Der Frank-Starling Mechanismus läuft auf der Ebene der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung an TnC und anschließenden regulatorischen Prozessen ab, während die Kraft-Frequenz-Beziehung hauptsächlich Veränderungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung unterliegt (ENDO, 1998). Die normalerweise geringen Unterschiede zwischen Links- und Rechtsherzpumpleistung können so ausgeglichen und eine Volumenverschiebung vermieden werden, bzw. der Auswurf bei veränderten Druck- und/oder Volumenverhältnissen kann auf diese Weise konstant gehalten werden. Durch den Frank-Starling-Mechanismus kann das Herzzeitvolumen auf das Doppelte des Ausgangswerts ansteigen (BEHRENDTS et al., 2017).

## 2.1.4 Mitochondriale Energetik

Wie schon im Abschnitt 2.1.2 Die Elektromechanische Kopplung und 2.1.3.1 Sympathikus angesprochen, ist ATP der Energielieferant der Zelle. Es wird an der Atmungskette (Electron Transport Chain; ETC) durch oxidative Phosphorylierung von ADP hergestellt. Lokalisiert ist die ETC an der inneren mitochondrialen Membran (IMM) und besteht aus 5 membranständigen Komplexen, wobei die ATP-Synthase (Komplex V) die eigentliche ATP-Synthese, durch den vorher über die Komplexe I bis IV aufgebauten Protonengradienten ( $\Delta\mu_{\text{H}}$ ), betreibt. Komplex I, III und IV agieren als Protonenpumpen (Abbildung 8).



**Abbildung 8: Atmungskette. Regulation der mitochondrialen ATP- und ROS- (Reaktive Sauerstoffspezies) Produktion in Kardiomyozyten;**

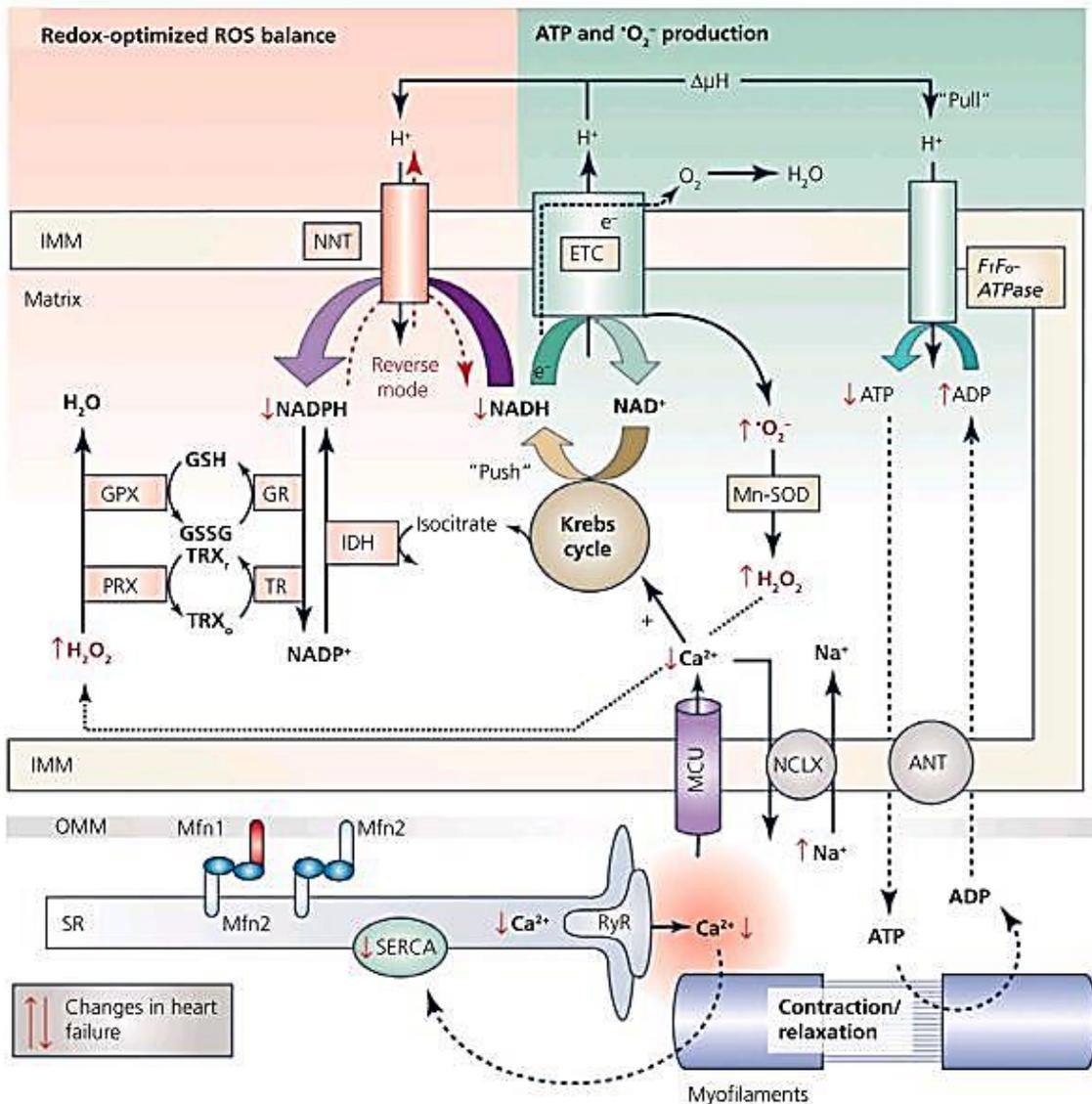
NADH und  $\text{FADH}_2$  geben Elektronen an Komplex I und II der Atmungskette (ETC) ab. Dies wird begleitet von einer  $\text{H}^+$ -Ionen Translokation durch die innere Mitochondrienmembran (IMM) in den

Intermembranraum (IMS), möglich durch sequenzielle Redoxreaktionen. Durch den Elektronenfluss zu Komplex III und IV, wird  $O_2$  zu  $H_2O$  synthetisiert. Primär wird  $O_2$  an Komplex I und am Q-Zyklus von Komplex III zu  $\cdot O_2^-$  verbraucht. Weitere Erläuterung der Atmungskette s. Text. (MAACK et al., 2014)

NADH, welches im Citratzyklus gebildet wird, gibt zwei Elektronen an Komplex I ab. Hierdurch wird der Export von vier Protonen ( $H^+$ -Ionen) von Komplex I, vier Protonen von Komplex III und zwei Protonen von Komplex IV gegen den Protonengradienten ( $\Delta\mu_H$ ) in den Intermembranraum (IMS) induziert. An Komplex IV werden gleichzeitig Elektronen auf Sauerstoff übertragen und anschließend zu einem Molekül  $H_2O$  synthetisiert (Abbildung 8). Komplex II oder auch Succinat-Dehydrogenase (Teil des Citratzyklus) nimmt zwei von  $FADH_2$  abgegebene Elektronen auf. Dies induziert wiederum den Export von sechs Protonen, vier von Komplex III und zwei von Komplex IV, sowie die Synthese eines  $H_2O$ -Moleküls.  $FADH_2$  erhält im vorherigen Schritt seine Elektronen aus der Synthese von Succinat zu Fumarat. Diese Reaktion ist Teil des Citratzyklus im mitochondrialen Stoffwechsel.

Komplex I und II übertragen ihre Elektronen zunächst auf Ubichinon (Q10; Coenzym Q), das in der IMM frei löslich liegt. Es transportiert die Elektronen zu Komplex III, wo es im sog. Q-Zyklus Protonen aus der Matrix in den IMS pumpen kann. Komplex III überträgt die erhaltenen Elektronen im nächsten Schritt auf Cytochrom C, ein Enzym auf der Außenseite der IMM, das sie anschließend an Komplex IV weitergibt. Komplex IV wiederum überträgt die Elektronen auf  $O_2$ , sodass der nun negativ geladene Sauerstoff aus der Matrix Protonen aufnehmen kann und  $H_2O$  bildet. Im letzten Schritt strömen Protonen mit dem Gradienten ( $\Delta\mu_H$ ) durch den  $F_0$ -Teil der ATP-Synthase in die mitochondriale Matrix. Durch eine so induzierte Konformationsänderung der ATPase können ADP und Phosphat an die  $F_1$ -Untereinheit binden und so zu ATP umgesetzt werden. Dieses wird an die Matrix abgegeben und kann nun in verschiedenste Stoffwechselprozesse einfließen (Abbildung 8). Dieser Vorgang kann nur maximal ablaufen, wenn hinreichend ADP vorhanden ist. Bei Absinken der ADP-Konzentration an der ATP-Synthase können nicht mehr ausreichend Protonen in die Matrix gepumpt werden. Der Protonengradient  $\Delta\mu_H$  steigt einhergehend mit dem Membranpotential  $\Delta\Psi_m$ , bis die Komplexe nicht mehr gegen diesen anpumpen können. Ist wieder ausreichend ADP als Substrat vorhanden, kann die ATP-Synthase erneut anlaufen und  $\Delta\mu_H$ , sowie  $\Delta\Psi_m$  werden abgeschwächt und überwindbar (RASSOW et al., 2016). Sobald ADP wieder zu ATP regeneriert wird, wird auch NADH wieder zu  $NAD^+$  oxidiert (sog. „Pull-Condition“). Wie schon im Abschnitt 2.1.2 Die Elektromechanische Kopplung angesprochen, gelangt  $Ca^{2+}$  über den MCU in die

mitochondriale Matrix, wo es den Citratzyklus aktiviert und die NADH-Regeneration anstößt (sog. „Push-Condition“). Diese Balance wird als „parallele Aktivierung“ bezeichnet (MAACK et al., 2017) (Abbildung 12). Bei gesteigerter Kontraktionsaktivität steigen sowohl ATP-Verbrauch als auch die mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme.



**Abbildung 9: Regulation der mitochondrialen Atmung und des Redoxstatus durch  $\text{Ca}^{2+}$  und ADP;** Gleichgewicht der mitochondriale ROS Produktion mit ROS-Elimination und den jeweiligen Kontrollmechanismen durch Ionenverschiebungen.

$\Delta\mu\text{H}$ , Protonengradient; ANT, Adeninnukleotidtranslokator; GPX, Glutathionperoxidase; GR, Glutathionreduktase; GSH/GSSG, reduziertes/ oxidiertes Glutathion; IDH, Isocitratdehydrogenase; IMM, innere Mitochondrienmembran; MCU, mitochondrialer  $\text{Ca}^{2+}$ -Uniporter; Mfn, Mitofusin; Mn-SOD, Mn<sup>2+</sup>-abhängige Superoxiddismutase; NCLX, mitochondrialer  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - (und  $\text{Li}^+$ ) Austauscher; NNT, Nikotinamid-Nukleotid Transhydrogenase; OMM, Äußere Mitochondrienmembran; PRX, Peroxiredoxin;

TR, Thioredoxinreduktase; TRXr/o, reduziertes/ oxidiertes Thioredoxin; RyR, Ryanodinrezeptor; SERCA, SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase; SR, sarkoplasmatisches Retikulum. (MAACK et al., 2017)

Eine entscheidende Größe in diesem Gleichgewicht sind die dabei entstehenden ROS-Emissionen (Abbildung 9). An den Komplexen I und III der Atmungskette entstehen, durch unvollständige Sauerstoffreduktion, laufend Superoxidradikale ( $\cdot\text{O}_2^-$ ). Bei Substrat-Angebot, aber in Abwesenheit von ADP, reduzieren die Elektronen von NADH kommend die Atmungskette und etablieren den  $\Delta\mu_{\text{H}}$ , wonach der Elektronenfluss und somit der O<sub>2</sub>-Verbrauch weitgehend sistiert. Wenn die ADP-Konzentration ansteigt, wird durch Dissipation des  $\Delta\mu_{\text{H}}$  an der F<sub>1</sub>F<sub>o</sub> ATP-Synthase der Elektronenfluss erhöht und die Atmungskette stärker oxidiert, was das Redoxpotential und somit die Radikalproduktion vermindert. Die Eliminierung der  $\cdot\text{O}_2^-$ -Radikale beginnt mit der Konversion zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> über die Mn<sup>2+</sup>-abhängige Superoxiddismutase. Das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wird wiederum über die Glutathionperoxidase (GPX) und das Thioredoxin/ Peroxiredoxin-System entgiftet (Abbildung 9). Für diesen Vorgang wird reduziertes NADPH benötigt, das im Citratzyklus regeneriert wird und damit von der Ca<sup>2+</sup>-induzierten Stimulation abhängt. Somit ist der Citratzyklus, neben der Regeneration von NADH für die Atmungskette, auch entscheidend für die Regeneration der antioxidativen Kapazität der mitochondrialen Matrix. Ca<sup>2+</sup> verlässt das Mitochondrium über den mitochondrialen Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauscher (NCLX) (Abbildung 9) (MAACK et al., 2014).

## **2.2 Herzinsuffizienz**

### **2.2.1 Definition & Epidemiologie**

Die Herzinsuffizienz (HI) ist der weltweit häufigste Grund für Hospitalisierung in Industrienationen (AMBROSY et al., 2014). 1995 definierte die WHO HI als „Unfähigkeit des Herzens, den Organismus ausreichend mit Blut und damit mit genügend Sauerstoff zu versorgen, um den Stoffwechsel unter Ruhe- wie unter Belastungsbedingungen zu gewährleisten“. Des Weiteren finden sich Definitionen wie „Unfähigkeit des Herzens, das vom Organismus benötigte Herzzeitvolumen bei normalem enddiastolischen Ventrikeldruck zu fördern“; oder „Verminderte körperliche Belastbarkeit aufgrund einer ventrikulären Funktionsstörung“ (HEROLD, 2018). Sie alle beschreiben dasselbe Syndrom. Das Herz kann nicht mehr die erforderliche Pumpleistung aufbringen, um den Körper regelrecht mit Blut und somit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen (HEROLD, 2018). Aktuell wird die Anzahl der an HI erkrankten Patienten weltweit auf 26 Millionen geschätzt (AMBROSY et al., 2014). Mindestens 2% der deutschen Bevölkerung sind von chronischer HI betroffen. Die Prävalenz ist altersabhängig. Bei <60-jährigen liegt sie bei <2%, während sie über 10% der >75-jährigen betrifft. Bei Männern handelt es sich um die vierthäufigste Todesursache; nach den chronisch ischämischen Herzerkrankungen, dem Myokardinfarkt und den bösartigen Neubildungen in Bronchien und Lunge. Bei Frauen liegt die Herzinsuffizienz auf Platz zwei nach der chronisch ischämischen Herzkrankheit (NEUMANN et al., 2009). Die meisten Patienten haben kardiovaskuläre Vorerkrankungen wie koronare Herzkrankheit (KHK), Hypertonie und Myokardinfarkt, Diabetes Mellitus, sowie Myokarditis, toxische Schäden und Klappendefekte (Tabelle 1). Die statistische Lebenszeitprävalenz an HI zu erkranken liegt bei 20%, für Patienten mit arterieller Hypertonie liegt sie höher. Es lässt sich für die nächsten 20 Jahre ein Trend auf bis zu 25% voraussagen. Die Ausgaben für die Therapie belaufen sich zur Zeit in Industrienationen auf 2% der Gesamtausgaben des Gesundheitssystems, mit erwarteter Erhöhung um 200% in den nächsten 20 Jahren (NEUMANN et al., 2009; METRA, TEERLINK, 2017).

<b>Framingham Heart Study</b>	
Hypertonie	49%
Koronare Herzerkrankung	29%
Diabetes mellitus	9%
Herzklappenerkrankungen	8%
Linksventrikuläre-Hypertrophie	5%

**Tabelle 1: Wesentliche ätiologische Faktoren der Herzinsuffizienz (Framingham Heart Study)**

(WEIL, SCHUNKERT, 2006)

Patienten mit HI haben i.d.R. eine schlechte Prognose mit hohen Hospitalisierungsraten. Für Patienten mit stabiler HI beläuft sich die Mortalität pro Jahr auf 6-7%, für jene mit akuter HI auf  $\geq 25\%$  (METRA, TEERLINK, 2017).

Aufgrund der geringen Sensitivität und Spezifität der klinischen Symptome werden Patienten oft erst nach Monaten oder Jahren diagnostiziert und initial häufig mit Verdacht auf andere Erkrankungen therapiert. Klinisch zeigen sich Dyspnoe, Fatigue, Orthopnoe (Atemnot bei Rückenlage), paroxysmale nächtliche Dyspnoe, Palpitationen, (Knöchel-) Ödeme, etc. (METRA, TEERLINK, 2017). Die klinischen Symptome können von bestimmten Zeichen (z. B. erhöhter Jugularvenendruck, gestaute Halsvenen, Rasselgeräusche über der Lunge oder periphere Ödeme) begleitet sein (ESC GIUDELINES, 2016).

Das Krankheitsbild Herzinsuffizienz wird in der Literatur auf unterschiedliche Weise unterteilt. Eine Klassifizierung ist anhand des Herzzeitvolumens (HZV) (Low- vs. High-Output-Versagen), der betroffenen Ventrikel (Links- vs. Rechts- vs. Globalinsuffizienz), des zeitlichen Verlaufs (Akute vs. Chronische HI) und der Pumpphase (systolische vs. diastolische HI  $\pm$  Kombination) möglich (HEROLD, 2018). Die Europäische Gesellschaft für Kardiologie veröffentlichte 2021 die in Tabelle 2 gezeigte Einteilung mit Bezug auf die Ejektionsfraktion (EF) (ESC SCIENTIFIC DOCUMENT GROUP et al., 2021).

Herzinsuffizienz-Typ		HFrEF	HFmrEF	HFpEF
Kriterien	1	Symptome ± Zeichen <sup>a</sup>	Symptome ± Zeichen <sup>a</sup>	Symptome ± Zeichen <sup>a</sup>
	2	LVEF ≤ 40%	LVEF 41-49% <sup>b</sup>	LVEF ≥ 50%
	3	-	-	Objektiv nachzuweisende kardial strukturelle und/ oder funktionale Abnormitäten in Kombination mit linksventrikulärer diastolischer Dysfunktion/ erhöhten linksventrikulären Füllungsdrücken unter erhöhten Serumkonzentrationen der natriuretischen Peptide <sup>c</sup>

**Tabelle 2: Definition der Herzinsuffizienz mit reduzierter (HFrEF), mäßiggradig eingeschränkter (HFmrEF) und erhaltener Ejektionsfraktion (HFpEF).**

HF, Herzinsuffizienz; LVEF, Linksventrikuläre Ejektionsfraktion; EF, Ejektionsfraktion

<sup>a</sup> Zeichen treten häufig nicht in frühen Erkrankungsstadien (v.a. bei HFpEF) und in gut eingestellten Patienten auf

<sup>b</sup> Für die Diagnosestellung der HFmrEF ist das Vorhandensein anderer struktureller Herzerkrankungen wahrscheinlicher (wie linksatriale Größenzunahme, linksventrikuläre Hypertrophie oder echokardiografische Hinweise auf eingeschränkte linksventrikuläre Füllung)

<sup>c</sup> Je höher die Zahl der vorhandenen Auffälligkeiten, desto wahrscheinlicher ist die Diagnosestellung der HFpEF

(ESC SCIENTIFIC DOCUMENT GROUP et al., 2021)

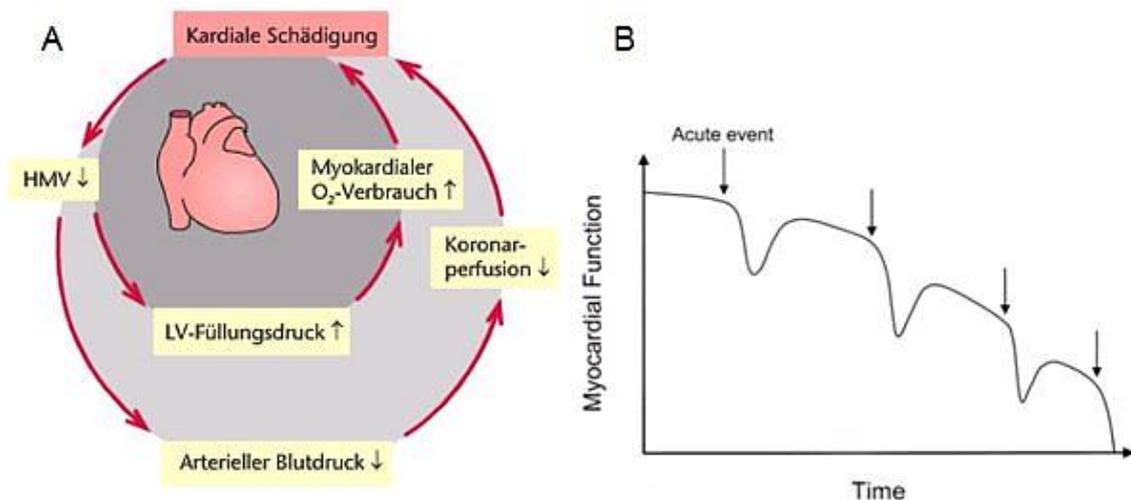
Die akute HI wird auch als akut dekompensierte HI (acute decompensated heart failure; ADHF) bezeichnet und kann je nach EF und peripherer Versorgung in einen kardiogenen Schock übergehen. Ätiologisch stehen folgende Phänomene im Vordergrund:

1. Myokardiales Pumpversagen  
(akutes Koronarsyndrom, Myokardinfarkt, hypertone Krise, Myokarditis)
2. Akut auftretende Insuffizienz- oder Shuntvitien  
(Papillarmuskelabriss bei Myokardinfarkt mit Segelklappeninsuffizienz, Ventrikelseptumdefekt, Klappenzerstörung bei Endokarditis)
3. Mechanische Behinderung der Ventrikelfüllung  
(Perikardtamponade)
4. Tachykarde/ bradykarde Herzrhythmusstörungen mit entsprechenden Symptomen

(erhöhte Atemfrequenz/ Ruhepuls/ Jugularvenendruck; periphere Ödeme/ Aszites; Rasselgeräusche, Hypoxie, Tachypnoe; Tachykardie/ Arrhythmie; Neues Herzgeräusch; Hypotherme Extremitäten; Oligurie)

(NVL VERSORGUNGSLEITLINIEN, BUNDESÄRZTEKAMMER (BÄK), 2017)

Es handelt sich um ein akut stationär zu behandelndes Krankheitsbild, während die chronische HI im Laufe von Monaten bis Jahren voranschreitet (Abbildung 10B) und im Rahmen des myokardialen Remodelings i.d.R. kompensiert verläuft (WEIL, SCHUNKERT, 2006), bzw. akut dekomensieren kann (HEROLD, 2018). Eine ADHF exazerbiert zu ~3% in einen kardiogenen Schock und zu ~15% in Hypoperfusion (Abbildung 10A). Dieser stellt ein lebensbedrohliches Krankheitsbild mit einer Krankenhaus-Mortalität von 70-90% dar (ERDMANN, 2011; OVIDIU et al., 2017).



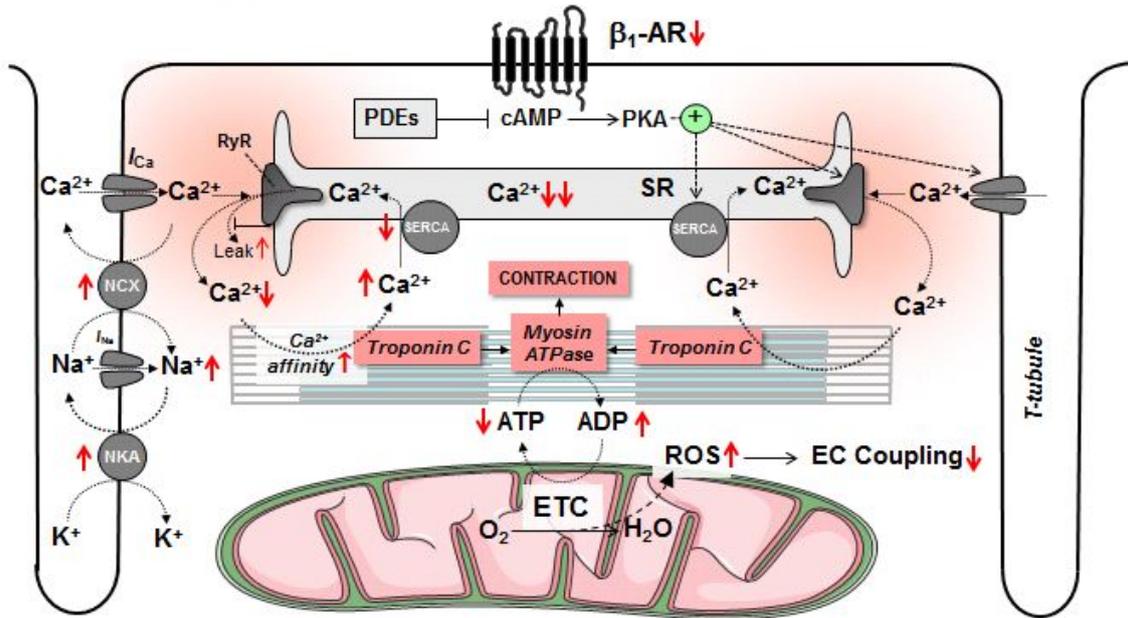
**Abbildung 10: Exazerbation Herzinsuffizienz**

**A:** Pathogenese des kardiogenen Schocks. HMV= Herzminutenvolumen; LV= linksventrikulär (BRAUN, MÜLLER-WIELAND, 2017). **B:** Zusammenhang akuter Dekompensationen (ADHF) mit Progression der Herzinsuffizienz. Nach jeder Episode, kurzzeitige Verbesserung, gefolgt von stetiger Verschlechterung der kardialen Funktion (GHEORGHIADÉ et al., 2005).

Während sich die Prognose von Patienten mit chronischer HI über die Jahre verbessert hat, ist die der ADHF gleichbleibend schlecht.

### 2.2.2 Pathophysiologie

Das Herz durchläuft beim Krankheitsbild der HI den Prozess des kardialen Remodelings. Dieses bringt Veränderungen in Struktur und Funktion der Kardiomyozyten sowie in der extrazellulären Matrix (auch in nicht infarziertem Gewebe) mit sich (Abbildung 11). Betroffen sind die Form und das Volumen des Herzens, progressive ventrikuläre Dilatation und beeinträchtigte Pumpfunktion, sowie Veränderungen der zellulären Signalwege, so z.B. im sympathischen Nerven- und im Renin-Angiotensin-Aldosteron System (MCMURRAY, 2010). Auf zellulärer Ebene entsteht ein Ungleichgewicht im  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt der Kardiomyozyten. Die systolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten sinken durch weniger  $I_{\text{ca}}$  ( $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal), was einen der Haupttrigger für die RyR-Aktivität darstellt. Die Aktivität der SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase sowie die Anzahl und Aktivität der SERCA-Pumpen, der RyR und der  $\beta$ -AR wird heruntergeregelt (GÓMEZ et al., 1997). Dadurch nimmt die Speicherkapazität des SR ab, was das zentrale Defizit der pathologisch veränderten EM-Kopplung darstellt (BERS, 2006). Durch die geringere Aktivität der SERCA-Pumpen mit folgender langsamerer  $\text{Ca}^{2+}$ -Wiederaufnahme ins SR sowie einer durch erhöhte intrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Konzentration bedingte Verlangsamung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Extrusion nach extrazellulär über den sarkolemmalen  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  Austauscher (NCX), wird die Relaxation der Myozyten verlangsamt (Abbildung 11). Dies verschlimmert sich insbesondere bei schnelleren Herzfrequenzen (HF), wenn die Dauer der Diastole verkürzt ist. In der Folge ist die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) vermindert (MULIERI et al., 1992; HASENFUSS et al., 1994a). Zusätzlich kann die erhöhte end-diastolische intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in Kombination mit einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit der RyR eine spontane SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung triggern. Dies ist wiederum Auslöser von ventrikulären Arrhythmien (MAACK et al., 2018).



**Abbildung 11: Die physiologische Elektromechanische Kopplung und ihre Veränderung bei systolischer Herzinsuffizienz im Rahmen des kardialen Remodelings.**

AR, Adrenorezeptor; cAMP, zyklisches Adenosinmonophosphat; ETC, Atmungskette; I<sub>Ca</sub> und I<sub>Na</sub>, Ca<sup>2+</sup>- und Na<sup>+</sup>-Einstrom; NCX: Na<sup>+</sup>-/ Ca<sup>2+</sup>-Austauscher; PDE, Phosphodiesterase; PKA, Proteinkinase A; RyR, Ryanodinrezeptor; SR, Sarcoplasmatisches Retikulum; SERCA, SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase; T-Tubulus, transversaler Tubulus; Rote Pfeile indizieren die Richtung der Veränderungen bei Herzinsuffizienz (MAACK et al., 2018).

Es ist nicht vollständig geklärt, ob die Herabregulation der β<sub>1</sub>-AR durch das kardiale Remodeling verursacht wird, oder ob der Körper das Herz vor den erhöhten Konzentrationen an zirkulierenden Katecholaminen zu schützen versucht. In humanem Myokard von Patienten mit chronischer HI sind die β<sub>1</sub>-AR selektiv um 60% in ihrer Anzahl verringert. Im Vergleich dazu waren die β<sub>2</sub>-AR in ihrer Anzahl unbeeinflusst und waren somit Hauptvermittler des inotropen Effekts unter Katecholaminstimulation (BRISTOW et al., 1982). Des Weiteren wurde das Verschwinden von aktiven Rezeptoren von der Zelloberfläche als Mechanismus für zelluläre Signalwege erkannt. Herunterregulation wird u.a. durch Phosphorylierung von Serin und Threonin an intrazellulären Domänen des Rezeptors aktiviert. Das Effektorenzym ist die PKA, die eigentlich an der Verbesserung der kardialen Funktion beteiligt ist. Diese Veränderungen haben eine temporäre Komponente, abhängig von akutem oder chronischem Stress (BERNSTEIN et al., 2011). Durch die Herunterregulation der β<sub>1</sub>-AR ist die Phosphorylierung wichtiger Ca<sup>2+</sup> verwertender Enzyme minimiert, so auch die der PKA. Die Folge ist eine Sensibilisierung der Myofilamente für Ca<sup>2+</sup>-Ionen, da die



mit folgendem Ungleichgewicht des Redoxstatus, was zu oxidativem Stress führt. Medikamente gegen dieses Ungleichgewicht in braun; CGP-37157, Inhibitor des mitochondrialen  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers; SS-31 Tetrapeptid, das an Cardiolipin bindet; MitoQ, reichert sich als Antioxidans im Mitochondrium an. ATP, Adenosintriphosphat; cyto, zytosolisch; ETC, Atmungskette; mito, mitochondrial; ROS, reaktive Sauerstoffspezies; SR, sarkoplasmatisches Retikulum;  $\beta$ -AR,  $\beta$ -Adrenorezeptor (MAACK et al., 2017).

Durch die ADP-induzierte Beschleunigung des Elektronenflusses entlang der Atmungskette wird NADH an Komplex I oxidiert. NADPH wird im Rahmen der Entgiftung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu  $\text{NADP}^+$  oxidiert. Die mitochondriale Transhydrogenase (NNT) reguliert das Gleichgewicht zwischen NADH und NADPH und ist hierbei an den Protonengradienten über der IMM gekoppelt (RYDSTRÖM, 2006) und kann je nach metabolischer Situation im vorwärts (NADPH-Regeneration) oder rückwärts gerichteten Modus (NADPH-Oxidation) agieren (NICKEL et al., 2015) (Abbildung 9). Bei erhöhtem ADP-Angebot durch höhere Kontraktionsarbeit und/ oder erniedrigte  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme ins Mitochondrium wird vermehrt NADPH zu NADH umgewandelt, um ATP zu regenerieren. Dies geschieht auf Kosten der antioxidativen Kapazität der Zelle. Die vermehrt in der Atmungskette entstehenden Superoxidradikale ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) werden zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  entgiftet, welches nicht mehr ausreichend über NAD(P)H abgepuffert werden kann. Zusätzlich ist der Eisengehalt von Kardiomyozyten bei HI reduziert. Dies resultiert in einer geringeren Expression antioxidativer Enzyme und geringerer Aktivität der Citratzyklus-Dehydrogenasen (MELENOVSKY et al., 2017). Die Folgen des anfallenden oxidativen Stresses sind zelluläre Dysfunktion, irreversibler Zellschaden und –tod, Nekrosen, Protein- und Lipidoxidationen, DNA-Schäden, linksventrikuläre Dysfunktion und erhöhte Mortalität bei Druckbelastung. ROS können direkt in den kontraktilen Apparat und zentrale Proteine des Querbrückenzyklus eingreifen und zelluläre Signalwege abändern (TSUTSUI et al., 2011; MAACK et al., 2017). Oxidativer Stress trägt entscheidend zur Entwicklung und Progression von HI bei und ist Mittelpunkt der derzeitigen Forschungen.

### 2.3 Therapie der Herzinsuffizienz

Die leitliniengerechte Therapie der chronischen Herzinsuffizienz (HI) zielt auf eine Verbesserung der Lebensqualität und des funktionellen Status des Herzens, der Vermeidung von Hospitalisierungen und der Senkung der Sterblichkeit des Patienten ab (NVL VERSORGUNGSLEITLINIEN, BUNDESÄRZTEKAMMER (BÄK), 2017).

Um eine Manifestation der HI zu verhindern, wird präventiv die Behandlung der jeweiligen Grunderkrankung (arterielle Hypertonie, KHK, Diabetes Mellitus, etc.) empfohlen, sowie eine Lebensstiländerung, wie Rauchentwöhnung und Alkoholverzicht nahegelegt. Kommt es dennoch zur Reduktion der EF (HFrEF), beginnt eine symptomatische Therapie mit  $\beta$ -Blockern, ACE-Inhibitoren, bzw. weiteren Eskalationsmöglichkeiten. Die genauen Behandlungsstrategien für die chronisch verlaufende HI sind in den Guidelines der European Society of Cardiology (ESC) und der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK) nachzulesen.

Das Therapieprinzip bei akuter Herzinsuffizienz; ADHF (Acute Decompensated Heart Failure) unterscheidet sich grundsätzlich, da es sich hier um ein plötzliches Ereignis, bzw. eine rapide Verschlechterung einer schon bekannten oder neu auftretenden (z.B. bei Papillarmuskelabriss) HI handelt (GHEORGHIADÉ et al., 2005). Die zwei primär tragenden Fragen in der Ersteinschätzung sind die mögliche Stauung von Blut vor dem Herzen (trocken = nicht gestaut; feucht = gestaut) und die periphere Endorganversorgung (warm = Endgebietsversorgung vorhanden; kalt = Keine sichere Endgebietsversorgung) (ESC GUIDELINES, 2016). Die Therapie der ADHF wird mehr an Erfahrungswerte und persönliche Meinung als an evidenzbasierte Studien geknüpft. Der Behandlungsplan gliedert sich in drei Phasen. In der ersten Phase stehen die Behandlung der akuten Symptomatik mit (Schleifen-) Diuretika (z.B. Furosemid) und Vasodilatoren (z.B. Nitrate) ( $\pm$ Opioide) im Vordergrund. In der zweiten Phase die Stabilisierung des Patienten und in der dritten die Aufrechterhaltung des Zustandes und Vorbeugung einer erneuten Dekompensation. Ist die hämodynamische Situation des Patienten kritisch, kann auf inotrope Medikamente zurückgegriffen werden, die die Endorganperfusion verbessern (TENEGGI et al., 2018). Im Falle eines kardiogenen Schocks ist der Einsatz von vasoaktiven Substanzen und Inotropika kaum zu vermeiden, wenn nötig müssen auch mechanische, kreislaufunterstützende Maßnahmen in Erwägung gezogen werden (ERDMANN, 2011).

### 2.3.1 Inotropika – Übersicht

Der Einsatz von inotropen Substanzen bei ADHF und im kardiogenen Schock muss in Bezug auf die Effizienz, die Toleranz und die Sicherheit abgewogen werden (TENEGGI et al., 2018). Die Komplikationsrate bei Einsatz ist hoch, weshalb die Indikation eng gestellt werden muss. Eine Zusammenfassung einiger aktueller Substanzen bietet Tabelle 3.

Inotrope Substanzen		
Calcium Mobilizer	Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> ATPase Inhibitoren	Digoxin
	PDE3-Inhibitoren	Enoximone, Milrinone, Pimobendan
	β-adrenerge Agonisten	Adrenalin, Noradrenalin, Dopamin, Dobutamin
Aktivatoren der SR-Ca <sup>2+</sup> -ATPase (SERCA)	Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> ATPase Inhibitor + SERCA-Aktivatoren	Istaroxime
	Ryanodin Rezeptor 2 + SERCA-Aktivatoren	CXL-1020
Substanzen mit dem Sarkomer als Zielstruktur	Ca <sup>2+</sup> -Sensitizer	Levosimendan Pimobendan
	Myosin Aktivatoren	Omecantiv Mecarbil
	Substanzen mit zusätzlichen myofilamentären Effekten	SR-33805 CXL-1020

**Tabelle 3: Inotropische Substanzen und deren Effektordomänen.**

(NAGY et al., 2014)

Bei hämodynamisch instabilen, akut dekompensierten ist der Einsatz von inotropen Substanzen oft alternativlos, obwohl der Sauerstoffverbrauch, die Arrhythmierate, Hypertrophie und Zelltod durch Gabe von Katecholaminen, Herzglykosiden (z.B. Digitalis) und PDE3-Hemmern zunimmt (sog. Ca<sup>2+</sup>-Mobilizer) (JEWITT et al., 1974; MAACK et al., 2018).

Die endogenen Katecholamine Noradrenalin (NA), Adrenalin und Dopamin binden an den β<sub>1</sub>-AR, sowie zu variablen Anteilen an β<sub>2</sub>-/ α<sub>1</sub>-AR und dopaminerge D<sub>1</sub>- und D<sub>2</sub>-Rezeptoren. Wie schon in Abschnitt 2.1.3.1 erwähnt, haben Katecholamine nicht nur kontraktionssteigernde Effekte, sondern auch zahlreiche andere wie z.B. eine Vasokonstriktion über die Bindung von Adrenalin und NA an α<sub>1</sub>-AR. NA kann beim kardiogenen Schock in Kombination mit anderen Inotropika verwendet werden, um den Blutdruck und die Organperfusion zu stabilisieren (ESC GUIDELINES, 2016). Dopamin wirkt in niedriger Konzentration vasodilatativ. Es erhöht so den Blutfluss des Herzens,

des Gehirns, der Nieren und anderer Organen. Neuere Studien an Patienten mit ADHF mit oder ohne Niereninsuffizienz zeigten neutrale Effekte auf eine renale Perfusionssteigerung (ROSE-Trial/ DAD-HF I+II Trial) (GIAMOZIS et al., 2010; CHEN et al., 2013; TRIPOSKIADIS et al., 2014). In höheren Dosierungen wirkt Dopamin über  $\alpha_1$ -AR vasokonstriktiv und damit Blutdruck-steigernd, sowie positiv inotrop und chronotrop über die  $\beta$ -ARs (MAACK et al., 2018). Bei Patienten im kardiogenen Schock wird durch die neuroendokrine Aktivierung Tachykardie und Vasokonstriktion induziert. Ein optimales Therapeutikum sollte positiv inotrop wirken und den systemischen Gefäßwiderstand (SVR) nicht weiter erhöhen. Dobutamin erfüllt diese Voraussetzungen (TUTTLE, MILLS, 1975). Es ist ein Agonist an  $\beta_1$ -AR ( $> \beta_2$ -AR  $\sim \alpha$ -AR) mit einem positiv inotropen Effekt (PIE), dessen Effektivität der von Isoprenalin (synthetischer  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -AR Agonist ohne  $\alpha$ -AR Effekte) ähnlich ist. Für jede Erhöhung der kardialen Kontraktilität steigen Blutdruck und HF nicht so stark an wie unter Dopamin oder NA. Neben den sehr positiven kurzfristigen Effekten, v.a. auf die Symptomverbesserung (FRANCIS et al., 2014) ist Dobutamin mit einer Steigerung des myokardialen Sauerstoffverbrauchs und Arrhythmien, Toleranzentwicklung und Mortalität assoziiert (TUTTLE, MILLS, 1975; RUFFOLO, 1987; TACON et al., 2012; STAPEL et al., 2017). NA ist als Zusatzkatecholamin im kardiogenen Schock indiziert, um eine Blutdruckerhöhung/ -stabilisierung und Organperfusion zu gewährleisten (ESC GUIDELINES, 2016). Im Gegensatz dazu steht der Einsatz von Adrenalin. Eine aktuelle Meta-Analyse zeigte eine dreifache Erhöhung der Mortalität unter Adrenalin (LÉOPOLD et al., 2018), sowie eine Verschlechterung von kardialen und renalen Biomarkern (TARVASMÄKI et al., 2016). Ebenso ist bei Z.n. Myokardinfarkt ein refraktärer kardiogener Schock 5-mal wahrscheinlicher als mit NA. Adrenalin führt bei vergleichbaren vasokonstriktorisches Effekten zu einer stärkeren Steigerung der Herzfrequenz als NA, was zu einer stärkeren Steigerung des myokardialen O<sub>2</sub>-Verbrauchs und Akkumulation von Lactat führt (LEVY et al., 2018). Nach diesen Daten stellt Adrenalin keine günstige Therapieoption im kardiogenen Schock dar.

Eine andere Gruppe von Inotropika sind die Phosphodiesterase-Inhibitoren (PDE-Inhibitoren). Unter diesen besteht keine Desensibilisierung oder Herunterregulation der  $\beta$ -AR, und sie agieren unbeeinflusst von  $\beta$ -Blockern. Im humanen, insuffizienten Myokard wird durch die Inhibition der PDE3 ein inotroper Effekt über  $\beta$ -AR potenziert (nicht aber durch Blockade der PDE4) (MOLENAAR et al., 2013). Umgekehrt verstärkt eine PDE4 Blockade in humanen Atriumzellen über  $\beta_1$ -/  $\beta_2$ -AR induzierte Arrhythmien, während eine PDE3 Blockade „nur“ durch  $\beta_1$ -AR verursachte Arrhythmien verstärkt

(MOLINA et al., 2012). Weiterhin vermitteln PDE-Inhibitoren über eine cAMP Erhöhung einen vasodilatativen Effekt und führen so zu einer Reduktion des SVR. Gewünscht ist dies bei ADHF und bei hohem Gefäßwiderstand. Dies limitiert allerdings die Anwendung im kardiogenen Schock, da hier eine Vasodilatation mit folgendem Blutdruckabfall nicht zuträglich zur hämodynamischen Situation des Patienten ist (MAACK et al., 2018).

Zurzeit sind Dopamin, Dobutamin und PDE3-Inhibitoren bei Hypotension (systolischer Blutdruck <90mmHg) und/ oder Symptomen der Hypoperfusion zur Erhöhung des kardialen Auswurfs und des Blutdrucks, sowie zur Verbesserung der peripheren Versorgung und Erhalt der Organfunktion indiziert (ESC GUIDELINES, 2016). Dennoch steht die Aktivierung von  $\beta_1$ -AR mit Induktion von Apoptose, linksventrikulärem Remodeling und Dysfunktion in Zusammenhang (NARULA et al., 1996; WENCKER et al., 2003). Dies verändert die myokardiale Substratverwertung und kann so ein energetisches Defizit und oxidativen Stress triggern (STAPEL et al., 2017).

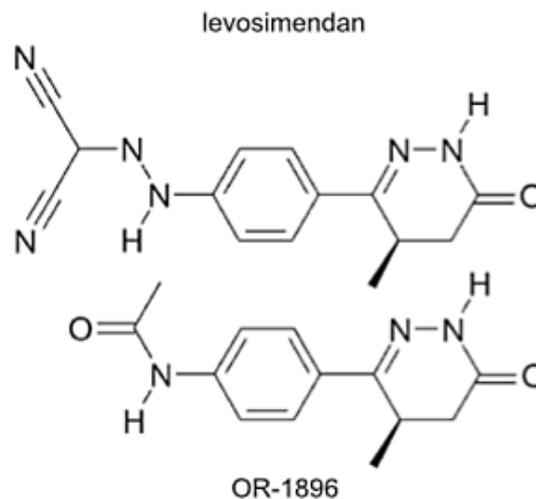
In den 1980er Jahren entstand eine neue Generation von Inotropika, die  $Ca^{2+}$ -Sensitizer. Sie versprachen eine Erhöhung der kardialen Kontraktilität ohne Aktivierung des  $\beta$ -adrenergen Systems, ohne eine Erhöhung des  $Ca^{2+}$ -Flusses, ohne den Sauerstoffverbrauch der Kardiomyozyten zu erhöhen und ohne vermehrt Arrhythmien auszulösen (POLLESELLO et al., 1994). Sie verschieben das Verhältnis von intrazellulärer  $Ca^{2+}$ -Konzentration und Schlagkraftentwicklung nach links, d.h., mehr Kraftentwicklung bei jeder gegebenen intrazellulärer  $Ca^{2+}$ -Konzentration.  $Ca^{2+}$ -Sensitizer sollen weder den  $Ca^{2+}$ -Fluss durch das Sarkolemm erhöhen, noch den  $Ca^{2+}$ -Strom (systolisch/ diastolisch) aus/ in das SR abändern. Dies soll weniger proarrhythmisch und weniger energieverbrauchend sein. Des Weiteren ist weder die HF noch der Blutdruck beeinflusst. Bei HI soll es zu keiner Toleranzentwicklung oder Desensibilisierung durch das  $\beta$ -adrenerge-/ cAMP-System kommen. Durch die meisten  $Ca^{2+}$ -Sensitizer wird die myokardiale Relaxation derart verlangsamt, dass die meisten Produzenten die Herstellung mit der Zeit einstellen (MAACK et al., 2018).

Im Gegensatz zur Entwicklung guter Therapiemöglichkeiten bei chronischer HI, sind die Bandbreite und die Auswahl an Präparaten für die akute Dekompensation, bzw. den kardiogenen Schock weiterhin begrenzt und nicht optimal.

### 2.3.4 Levosimendan

Die finnische Firma Orion Pharma entwickelte mit Erstzulassung im Jahr 2000 in Schweden, die Substanz Levosimendan (Levo). Es wurde unter dem Handelsnamen Simdax 2013 erstmals in Deutschland und der Schweiz zugelassen (PREM, SCHWINGER, 2015). Seither findet es als etablierte Substanz zur Zusatzbehandlung der akuten dekompensierten Herzinsuffizienz (ADHF) Anwendung im klinischen Alltag. Zunächst wurden sowohl perioperativer Gebrauch, Sepsis, kardiogener Schock und rechtventrikuläre Dysfunktion als Indikationen beschrieben, diese nach Erlangen von Erfahrungswerten und einer verbesserten Studienlage stets weiter eingegrenzt.

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitizer wurden zu Anfang, je nach Bindungsdomäne am kontraktilem Apparat, in drei Klassen eingeteilt (SCHWINGER, BRIXIUS, 2005), siehe dazu Abbildung 14. Levosimendan (Levo; Propanedinitril [[4-(1,4,5,6-tetrahydro-4-methyl-6-oxo-3-Pyridazinyl)Phenyl]Hydrazonol] (R)) wurde 1994 zur  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Bindung an TnC entwickelt und als Klasse II  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitizer eingestuft (HAIKALA et al., 1995b; SCHWINGER, BRIXIUS, 2005).

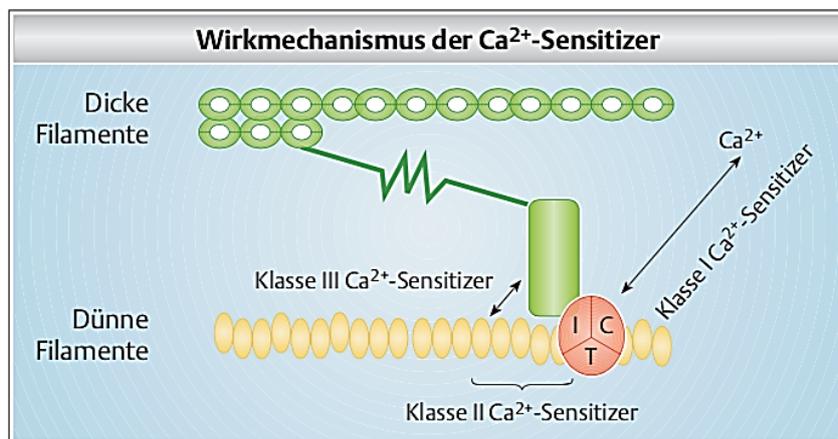


**Abbildung 13: Molekulare Struktur von Levosimendan;**

Propanedinitril [[4-(1,4,5,6-tetrahydro-4-methyl-6-oxo-3-Pyridazinyl)Phenyl]Hydrazonol] (R) und seines aktiven Metaboliten OR-1896, Azetamid N-[4-(1,4,5,6-tetrahydro-4-methyl-6-oxo-3-Pyridazinyl)Phenyl] (SZILÁGYI et al., 2004).

Levo stabilisiert die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an TnC und verlängert die Bindung von TnC an TnI, ohne die  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität zu erhöhen (POLLESELLO et al., 1994). Die für die  $\text{Ca}^{2+}$ -

Sensibilisierung verantwortliche Bindungsstelle befindet sich innerhalb eines hydrophoben Abschnitts der N-Domäne nahe der sogenannten D/E Linker-Region des TnC (SORSA et al., 2003; ROBERTSON et al., 2010). Die Konsequenz ist die Stabilisierung des mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen gesättigten TnC (SORSA et al., 2001) mit Verlängerung der Bindung zwischen TnC und TnI beim Kraftschlag, ohne eine Beeinflussung der totalen Anzahl von bindenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Man geht mittlerweile davon aus, dass die Wirkung  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig ist und der kontraktile Apparat nur bei hohen intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen sensibilisiert wird. Die Relaxation verbleibt aufgrund des schnellen Abdiffundierens des  $\text{Ca}^{2+}$  in der Diastole, sowie durch die nur milde Sensibilisierung ungestört (HAIKALA et al., 1995a).



**Abbildung 14: Schema zur Klasseneinteilung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitizer anhand des Wirkmechanismus.**

Klasse-I- $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitizer greifen in die Interaktion von Troponin C (TnC) mit  $\text{Ca}^{2+}$  ein;  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitizer der Klasse II greifen an den dünnen Filamenten an und erleichtern die Aktin-Regulation durch den Komplex der dünnen Filamente mit  $\text{Ca}^{2+}$ . Im Unterschied zu den Klasse-I- $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitizern beeinflusst diese Gruppe aber nicht die  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität von TnC.  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitizer der Klasse III greifen  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig direkt in den Querbrückenzyklus ein (SCHWINGER, BRIXIUS, 2005).

Levo und sein aktiver Metabolit OR-1896 sind keine reinen Sensitizer (SANDELL EP et al., 1995). Bei Metabolisierung werden etwa 5% der Gesamtmenge im Dickdarm zu OR-1855 umgesetzt. In der Leber wird dieses zu dem aktiven Metaboliten OR-1896 acetyliert. Levo bindet zu 98% an Plasmaproteine, OR-1896 nur zu 40%, weshalb es bei niedrigen totalen Plasmakonzentrationen signifikante klinische Effekte entfalten kann (SANDELL EP et al., 1995; PAPP et al., 2012). Levo wird bei Therapiebeginn i.v. über eine Ladungsdosis und anschließend über eine 24-stündige Infusion verabreicht (KIVIKKO et al., 2002). Anders als Levo mit einer HWZ von 1-1.5 Stunden hat OR-1896 eine Wirkdauer von 7-9 Tagen (HWZ 75-80 Stunden). Die pharmakokinetischen

Eigenschaften von Levo sind bei renaler und hepatischer Insuffizienz unverändert, während die Ausscheidung des Metaboliten verlängert sein kann (PUTTONEN et al., 2008). OR-1896 agiert annähernd identisch zu Levo (TAKAHASHI et al., 2000; SZILÁGYI et al., 2004). Es hat eine 4,5-fach schwächere  $\text{Ca}^{2+}$ -sensibilisierende Wirkung und einen 38-fach schwächeren PDE3 inhibitorischen Effekt (ØRSTAVIK et al., 2015). Die beiden Substanzen wirken über Bindung an TnC schlagkraftverstärkend und sind spezifische Inhibitoren der PDE3 mit 1000-fach stärkerer Affinität für PDE3 > PDE4 (RAASMAJA et al., 1997; ZIMMERMANN et al., 1998; AJIRO et al., 2002; SZILÁGYI et al., 2004). Sie sind weiterhin Induktoren eines ATP-abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanals ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ ) am Sarkolemm glatter Muskelzellen mit folgender Vasodilatation. Gezeigt wurde dies an Arterien der pulmonalen, koronaren und peripheren Systeme, sowie an hepatischen Venen (PAPP et al., 2012). Levo ist ebenfalls Induktor eines mitochondrialen  $\text{K}^+$ -Kanals ( $\text{I}_{\text{KATP}}$ ) in Kardiomyozyten (PATARICZA et al., 2000; POLLESELLO et al., 2016). Dies soll die Vor- und Nachlast von Patienten unter Therapie senken, den koronararteriellen Fluss steigern und somit eine kardioprotektive Wirkung entfalten (KAHEINEN et al., 2001; LABRIOLA C et al., 2004). Nicht zuletzt auch über BNP-Senkung (brain natriuretisches peptid), Zytokinmodulation, anti-ischämische, anti-stunning und neurohumorale Effekte. Nach Myokardinfarkt kann durch Anstieg der Koronararterienperfusion das Infarktareal verkleinert werden (PAPP et al., 2012). Levo agiert zusätzlich synergistisch zu nukleotidischen Diphosphaten. Diese Eigenschaften kann helfen infarziertes, ischämisches Myokard zu schützen, da die Aktivierung von  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanälen in Geweben mit wenig ATP und viel angefallenem ADP weniger Energie benötigt (YOKOSHIKI et al., 1997). Es ließ sich keine Erhöhung des myokardialen Sauerstoffverbrauchs feststellen (UKKONEN et al., 2000).

Wie schon in Abschnitt 2.3 *Therapie der Herzinsuffizienz* beschrieben, wird zu Beginn der Akuttherapie des kardiogenen Schocks mit i.v. Diuretika und Vasokonstriktoren behandelt. Bei Aggravierung der Symptomatik sind positiv inotrope Substanzen, z.B. Dobutamin oder PDE3-Inhibitoren (wie Milrinon oder Enoximon) indiziert. Diese Substanzen führen zur akuten Stabilisierung, mittel- und langfristig haben sie allerdings keinen positiven Einfluss auf das Überleben. In einer Meta-Analyse von klinischen Studien der letzten 20 Jahre unter Berücksichtigung von knapp 29.000 behandelten Patienten, konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die Mortalität unter inotroper und vasopressorischer Therapie ebenfalls nicht ansteigt (BELLETTI et al., 2015). Levo ist in der Akutbehandlung additiv zu  $\beta$ - und  $\alpha$ -agonistisch wirkenden Substanzen, sowie zu  $\beta$ -AR-Antagonisten einsetzbar („Add-on Therapie“) (DELLE KARTH et al., 2003;

ZOBEL et al., 2004). Zusätzlich zeigten sich keine Tendenzen zur Auslösung von Arrhythmien; das elektrophysiologische Profil verblieb ausgeglichen (SINGH et al., 1999; LILLEBERG et al., 2004).

In einer Meta-Analyse über den positiven Effekte der Substanz aus dem Jahr 2012 wird ein signifikanter Rückgang der Mortalität beschrieben, allerdings galt der kardiogene Schock als Ausschlusskriterium (LANDONI et al., 2012). In anderen Quellen konnte kein verbessertes Überleben bestätigt werden (LEONARDO DE LUCA et al., 2006; SAMIMI-FARD et al., 2008). Die Literatur ist im Hinblick auf die Senkung oder Neutralität in Bezug auf die Mortalitätsrate gespalten. Als Zusatztherapie bei nicht ausreichendem Ansprechen auf eine Katecholamintherapie ist der Einsatz von Levo dennoch eine wertvolle Ergänzung (ZOBEL et al., 2004). Die perioperative Verwendung von Levo nach herzchirurgischen Eingriffen (bis 48 Stunden nach OP) bzw. bis Beendigung der intensivmedizinischen Betreuung zeigte in der CHEETAH-Studie keinen positiven Effekt auf die 30-Tage Mortalität (LABRIOLA C et al., 2004; MEHTA et al., 2017). Für den Nutzen von Levo im Rahmen einer schweren Sepsis und des septischen Schocks wurden 10 klinische Studien mit insgesamt 1036 Patientin verglichen. Es konnte keine Senkung der Mortalität, aber eine Verminderung des S-Laktats mit myokardialer Kontraktilitätssteigerung und einer Verbesserung der linksventrikulären EF gezeigt werden. In Falle einer Sepsis ist die Therapie als „Add-on“ dennoch nicht zufriedenstellend (CHANG et al., 2018). Allgemein werden kardioprotektive Eigenschaften, wie Symptomverbesserung, Abnahme des NT-proBNP und Effizienz bei gleichzeitiger  $\beta$ -Blocker Therapie beschrieben. Andere Indikationen zum Einsatz von Levo sind ohne weitere evidenzbasierte Studien limitiert (GARCÍA-GONZÁLEZ et al., 2005; ARCHAN, TOLLER, 2008).

Kontraindikationen für den Einsatz von Levo sind generelle Hypersensibilität gegenüber der Substanz selbst oder Inhaltsstoffen, schwere Hypotension und Tachykardie, signifikante mechanische Obstruktion, die die ventrikuläre Füllung oder Auswurf behindert, schwere renale Insuffizienz mit einer Kreatininclearance  $<30$  ml/min, schwere hepatische Insuffizienz und Torsades de Pointes Rhythmusstörung. Des Weiteren ist die Applikation nur im hospitären Rahmen, mit adäquaten inotropen Behandlungsmöglichkeiten, zugelassen. Die allgemeine Dosierungsempfehlungen sind eine initiale Dosis von  $6-12 \mu\text{g/kg}$  i.v. über 10 min und im Anschluss  $0,1 \mu\text{g/kg/min}$  i.v. über 24 h (BFARM, 2009). Nach Beendigung der 24-stündigen Infusion wirkt Levo mit seinem aktiven Metaboliten OR-1896 über 3-5 Tage (KIVIKKO et al., 2002). Studien

über den oralen Einsatz von Levo bei schwerer chronischer HI zeigten positive kardiale und hämodynamische Effekte, die dem i.v. Gebrauch ähnlich sind (HARJOLA et al., 1999). In weiteren Untersuchungen über den oralen Nutzen zeigten Dosen zwischen 4-8 mg moderate inotrope Effekte und Steigerungen der HF, während der Blutdruck unbeeinflusst blieb (PÖDER et al., 2004). Dennoch ist die Zulassung in Deutschland bisher auf den i.v. Einsatz beschränkt (BFARM, 2009). Für die Effekte von Levo siehe auch Tabelle 4.

Effekte		Levosimendan	Omecamtiv Mecarbil
<b>Molekulare Angriffspunkte</b>	Kardiales Troponin C	x	
	Kardiales Myosin		x
	b-schwere Ketten		x
	PDE3	x	
	PDE4		
	K <sub>ATP</sub> -Kanäle	x	
<b>Pharmakologische Eigenschaften</b>	Inotropie	↑	↑
	Lusitropie	↑	
	Vasodilatation	↑	
	Periphere Perfusion	↑	
	Kardiale Protektion	↑	
	Chronotropie	↔↑	↓
<b>Klinische Effekte</b>	Kardialer Auswurf	↑	↑
	Kapillar pulmonaler Wedge Druck		
	Dyspnoe, Fatigue	↓	↔↓
	Neurohormone	↓ ANP/BNP	
<b>Gegenteilige klinische Effekte</b>	Hypotension	↑	↔
	Artriale Arrhythmien	↔↑	
	Ventrikuläre Arrhythmien	↔	↔
<b>Mortalität</b>		↔↓	

**Tabelle 4: Molekulare Angriffspunkte, Wirkmechanismen, pharmakologische und klinische Effekte von Levosimendan und Omecamtiv Mecarbil.**

(ENDO, 2001; POLLESELLO et al., 2016)

Die klinischen Studien über Levo sind zahlreich. Um dennoch einen Überblick zu geben, sind im Folgenden ausgewählte Arbeiten aufgeführt. Die LIDO-Studie untersuchte den hämodynamischen Effekt von Levo vs. Dobutamin. Levo verbesserte

die Vitalparameter effektiver und reduzierte die 180-Tage Mortalität im Vergleich zu Dobutamin (FOLLATH et al., 2002; MEBAZAA et al., 2009). In der SURVIVE-Studie konnte Levo die Mortalität nach 180 Tagen im Vergleich zu Dobutamin nicht senken. Es zeigten sich 5 Tage nach Randomisierung eine BNP-Reduktion und gute Effekte auf die Hämodynamik sowie bessere Ergebnisse bei vorausgegangener  $\beta$ -Blocker-Therapie (MEBAZAA et al., 2007; MEBAZAA et al., 2009). Levo war in der REVIVE-Studie (Levo vs. Placebo) mit Hypotension, kardialen Arrhythmien während der Infusionsphase und nicht signifikant reduzierten Todesfällen (trotz verbesserten Symptomen und BNP-Reduktion) assoziiert (PACKER et al., 2013).

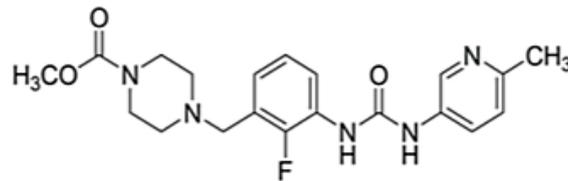
Allgemein war Levo bei der Behandlung nach akutem Myokardinfarkt (RUSSLAN-Studie) mit einem signifikant gesunkenem Risiko für Tod und Exazerbation von HI assoziiert (MOISEYEV et al., 2002). In der CHEETAH- und LEVO-CTS-Studie konnte Levo das Outcome von Patienten mit systolischer HI nach kardialen Operationen nicht verbessern, obwohl die Notwendigkeit der Anwendung von Katecholaminen 24 h postoperativ reduziert war (LANDONI et al., 2017; MEHTA et al., 2017). In einer neuen Pilotstudie (LION-HEART) an 69 ambulanten Patienten mit fortgeschrittener HI, erhielten die Teilnehmer über 3 Monate alle 2 Wochen Levo-Infusionen. Es konnten ein Rückgang von NT-proBNP, verbesserte Lebensqualität der Patienten und reduzierte Hospitalisierungen ohne wegweisende Komplikationen erreicht werden (COMÍN-COLET et al., 2018). Diese Ergebnisse sollten in größeren Studien validiert werden.

Die diastolische Relaxation verbleibt, wie oben bereits erwähnt, durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -konzentrationsabhängige Bindungsverstärkung von Levo, als auch durch die PDE3 inhibitorische Wirkung, unbeeinflusst (BOKNÍK et al., 1997). Durch Inhibierung des cAMP-Abbaus wird eine Kaskade angestoßen, die zusätzlich  $\text{Ca}^{2+}$  ins Zytosol pumpt und somit eine Balance zwischen ADP und  $\text{Ca}^{2+}$  erzeugt (Abbildung 12). Bei Inhibition der PDE3 mit Cilostamid (selektiver PDE3 Inhibitor) ist die Levo Wirkung in Ratten aufgehoben. Im Vergleich wurde die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration mit dem reinen  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitizer EMD-57033 (EMD) nicht beeinflusst, was die Frage nach dem tragenden Levo Effekt aufwirft. *In vitro* hat Levo allein kaum Auswirkung auf die Zellen. Bei gleichzeitiger  $\beta$ -adrenerger (Vor-)Stimulation zeigen sich die besten Ergebnisse in Bezug auf die Kontraktionskraftsteigerung (ØRSTAVIK et al., 2014). Bei  $\beta$ -Rezeptor Blockade mit Timolol blieben die inotropen und lusitropen Effekte von Levo fast vollständig aus. Unter EMD kann, bei PDE3 Inhibition durch Cilostamid, eine deutliche

inotrope Reaktion verzeichnet werden, bei Levo bleibt diese aus. So ist die Frage, ob und inwiefern tatsächlich eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensibilisierung vorhanden ist (ØRSTAVIK et al., 2015).

### 2.3.3 Omecamtiv Mecarbil

2005 wurde der kleinmolekulare Myosinaktivator Omecamtiv Mecarbil (OM) oder auch CK-1827452 als erstes Präparat einer neuen Gruppe von Inotropika entwickelt (Abbildung 15) (MORGAN et al., 2010). Anstatt von  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensibilisierung verhilft es dem kardialen Myosin direkt zur Verstärkung des Kraftschlags, ohne eine Erhöhung des Energieverbrauchs oder der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Ziel dieses Designermoleküls ist die Therapieverbesserung der systolischen HI.



**Abbildung 15: Molekulare Struktur von Omecamtiv Mecarbil ( $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{FN}_5\text{O}_3$ ).**

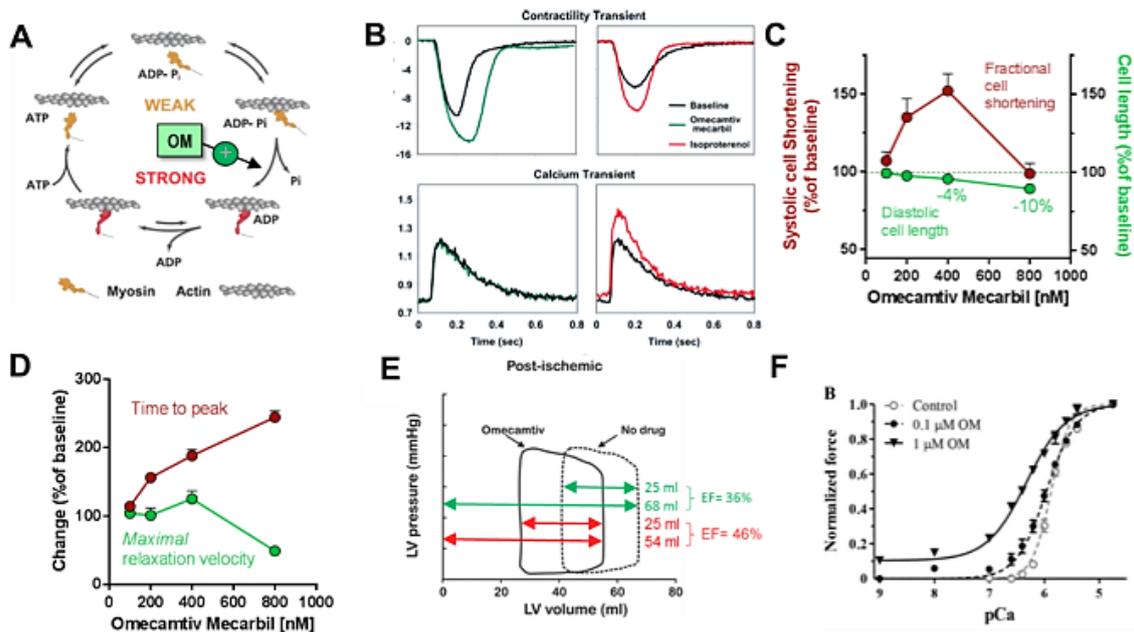
(MALIK et al., 2011)

Die orale Bioverfügbarkeit der Substanz liegt bei 90% (ohne dosisabhängige Aufnahme) mit einer HWZ von 18,5 Stunden ohne Beeinflussung der Pharmakokinetik durch Grundparameter wie Alter, Geschlecht und Gewicht. Der maximale Wirkeintritt wird 1 Stunde nach Administration verzeichnet und die OM-Plasmakonzentration ist direkt proportional zur SET-Erhöhung in gesunden Probanden und Patienten mit HI. Die Plasmaproteinbindung liegt bei 81,5%. Die Metabolisierung verläuft hauptsächlich über Decarboxylierung und in Anteilen über CYP3A4/ CYP2D6 Induktion mit ~8% direkter renaler Ausscheidung (VU et al., 2015).

Der limitierende Faktor der myofilamentären Kontraktion ist die Phosphatabdissoziation im Querbrückenzyklus (s. 2.1.2 *Die Elektromechanische Kopplung*). Erst danach kann durch den Kraftschlag ein Verschieben der Myofilamente erreicht werden (MEIJS et al., 2012). OM bindet an die sog. humane  $\beta$ -kardiale Motordomäne (cMD) des Myosins. Durch allosterische Veränderungen der  $\beta$ -Faltblattkonstitution kann die Aktin-Bindungsstelle mit der Nukleotidtasche gekoppelt und stabilisiert werden. Durch die

Stabilisierung des Prä-Kraftschlagstadiums erhöht sich die Freisetzungsrates von Phosphat (Abbildung 16A). OM setzt die Schwelle zur Aktivierung der Myosin ATPase herab, was diesen Zustand zusätzlich verstärkt (MALIK et al., 2011; WINKELMANN et al., 2015; PLANELLES-HERRERO et al., 2017). Dem folgt eine höhere Umsetzung der schwachen in starke Myosin-Aktin-Bindungen (physiologisch liegen mehr schwache Bindungen vor) und mehr Myosinköpfchen binden an Aktin („mehr Hände ziehen an einem Seil“) (MALIK et al., 2011). OM beeinflusst kein außerkardiales Myosin. Die Wechselwirkungen unter OM-Bindung und die allosterischen Veränderungen bilden die strukturelle Basis für die kinetische und mechanische Abstimmung des Myokards.

Die systolische Ejektionszeit (SET) wird über den o.g. Mechanismus verlängert, die myokardiale Kontraktionskraft und Energieeffizienz steigen (Abbildung 16B-D), die HF und die intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Transienten bleiben unbeeinflusst (Abbildung 16B). Durch Verlängerung der Systole wird die Diastolendauer entsprechend verkürzt (MEIJS et al., 2012).



**Abbildung 16: Wirkmechanismus und Effekte von Omecamtiv Mecarbil;**

**A:** Mechanochemischer Myosinzyklus. Gelb: Schwache Myosin-Aktin Bindungen; Rot: Starke Myosin-Aktin Bindungen; Omecamtiv Mecarbil (OM) erhöht die Umwandlungsrate von Myosin in die starken, krafterzeugenden Myosinbindungen. **B:** Repräsentative Darstellung einer myozytären Kontraktion. OM (200nM) erhöht die Dauer und die Amplitude der Zellverkürzung, ohne Effekt auf den zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Transienten. Im Gegensatz dazu erhöht der  $\beta$ -adrenerge Agonist Isoprenalin die Zellverkürzung durch Anhebung des zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Transienten. **C:** Fraktionierte Zellverkürzung und diastolische

Zelllänge von isolierten Ratten-Kardiomyozyten bei ansteigenden OM-Konzentrationen. **D**: Zeit zum Verkürzungsmaximum und maximale Relaxationsgeschwindigkeit von isolierten Ratten-Kardiomyozyten bei ansteigenden OM-Konzentrationen. **A-D**: (MALIK et al., 2011). **E**: Effekt von OM (20 Minuten Infusion; dosiert für 20% Verlängerung der systolischen Ejektionszeit) auf die linksventrikuläre Druck/Volumen-Kurve in einem Schweinemodell bei myokardialen Stunning („post-ischämisches“ Herz). Die Volumina stehen für das linksventrikuläre Schlag- und enddiastolische Volumen, aus welchen sich die Ejektionsfraktion berechnet. (BAKKEHAUG et al., 2015). **F**: Effekt von OM bei 0.1 oder 1µM bei normalisierter, isometrischer Kraft als Antwort auf steigende  $[Ca^{2+}]$  an Ratten-Kardiomyozyten. (NAGY et al., 2015)

Allerdings wird die systolische Funktion auf Kosten der diastolischen Funktion verbessert. Die diastolische Vorspannung der Kardiomyozyten steigt, die totale Zelllänge stellt sich verkürzt dar (Abbildung 16C). Dies bestimmt u.a. die therapeutische Breite des Präparats. In Ratten Kardiomyozyten überwiegt bei 200-400 nM OM-Konzentrationen die systolische Kontraktionsverbesserung die steigende diastolische Spannung. Bei einer Konzentration von 800 nM finden sich gegenteilige Effekte. In einem *in vivo* Schweinmodell nach myokardialen Stunning mit Ischämie und Reperfusion fand sich ein Punkt, an welchem OM das end-systolische und end-diastolische Volumen in gleichem Maße beeinflusste (Abbildung 16E/F). Die SET Steigerung lag hier bei 20%, die linksventrikuläre EF erschien zunächst erhöht. Bei gleichzeitig nicht erhöhtem SV wurde dieser Effekt im Anschluss dennoch als eine Pseudoerhöhung gewertet (BAKKEHAUG et al., 2015). Die Effekte auf den kardialen Auswurf in humanen Modellen mit und ohne HI waren geringer als in Hunden mit HI (SHEN et al., 2010). Aufgrund der Ergebnisse auf post-ischämische Schweine (BAKKEHAUG et al., 2015) muss erörtert werden, ob der Effekt OMs auf die SET, bzw. das SV, durch eine (z.T.) Senkung des end-diastolischen Volumens bzw. der diastolischen Füllung zu Stande kommt. Die Verbesserung der NT-pro-BNP Spiegel in der COSMIC-HF Studie (TEERLINK et al., 2016c) spricht allerdings gegen eine relevante diastolische Verschlechterung innerhalb der therapeutischen Breite (TEERLINK et al., 2016b). OM wurde inzwischen in einer Phase III Studie an >8.000 Patienten mit HFrEF getestet (TEERLINK et al., 2020). OM verbesserte hierbei den kombinierten Endpunkt aus kardiovaskulärer Sterblichkeit und Hospitalisierung für Herzinsuffizienz signifikant um 8%, allerdings ohne die Einzelkomponenten des primären Endpunktes allein zu reduzieren (TEERLINK et al., 2020). Der Effekt war stärker ausgeprägt bei Patienten mit geringerer LVEF, erhöhtem NT-proBNP, schwerer Herzinsuffizienz und bei hospitalisierten Patienten; (TEERLINK et al., 2020; FELKER et al., 2021; TEERLINK et al., 2021). Die Zulassung der Substanz zur Therapie der Herzinsuffizienz ist beantragt, und das Profil der Substanz spricht für einen

personalisierten Gebrauch bei Patienten mit fortgeschrittener HFrEF und niedriger LVEF. Eine weitere Studie mit einer anberaumten Laufzeit bis Ende 2021, METEORIC-HF, untersucht die Belastungskapazität von Patienten mit chronischer HI vor und nach 20-wöchiger OM-Therapie (NCT03759392). Die Ergebnisse sind zum aktuellen Zeitpunkt noch ausstehend.

## 2.4 Fragestellung der Arbeit

Da das Zusammenspiel von Elektromechanischer Kopplung und mitochondrialer Energetik von besonderer Bedeutung für die Regulation des Redoxstatus und der Produktion von Sauerstoffradikalen ist, war das Ziel dieser Arbeit, den Einfluss von Levosimendan und Omecamtiv Mecarbil auf diese Parameter in isolierten Herzmuskelzellen des Meerschweinchen zu ergründen. Hierfür wurden spezifisch die folgenden Fragestellungen adressiert:

1. Welchen Einfluss haben Levosimendan und Omecamtiv Mecarbil in verschiedenen Dosierungen auf die Parameter der Zellverkürzung?
2. Wie verändert sich der medikamentöse Effekt bei  $\beta$ -adrenerger Co-Stimulation?
3. Haben die Substanzen Einfluss auf den mitochondrialen Redoxstatus in kardialen Muskelzellen? Kommt es zu einem vermehrten Verbrauch der Redoxäquivalenten NAD(P)H und FADH<sub>2</sub>?
4. Welchen Einfluss haben die Substanzen auf den Ca<sup>2+</sup>-Fluss in der Zelle?
5. Gibt es Effekte auf das mitochondriale Membranpotential ( $\Delta\Psi_m$ )?

Der erste Teil dieser Arbeit beschreibt die Auseinandersetzung mit der bereits seit dem Jahr 2000 etablierten Substanz Levosimendan. Das Ziel der Untersuchungen war zum einen die Bestimmung der Einflusskomponente von  $\beta$ -adrenerger Kostimulation auf die Erhöhung der Kontraktionsamplitude mit der Frage nach PDE3-Inhibition vs. Ca<sup>2+</sup>-Sensibilisierung und dementsprechend der Frage, ob vermehrt oxidativer Stress in den Mitochondrien anfällt, was über die Messungen von NAD(P)H/ FADH zu untersuchen ist. Um dies genauer zu eruieren, wurde zum anderen die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration bestimmt. Durch Korrelation der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration mit der jeweiligen Sarkomerlänge können Hinweise auf eine Veränderung der Ca<sup>2+</sup>-Sensitivität der Myofilamente geschlossen werden.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Substanz Omecamtiv Mecarbil, die über einen neuen Wirkmechanismus, der Myosinaktivierung, agiert. Die Versuchsreihe

wird mit der Frage nach der effizientesten Dosierung eröffnet. Wo finden sich die meisten förderlichen und wo die am wenigsten schädlichen Effekte auf die Kontraktilität? Durch Bestimmung der Autofluoreszenz von NAD(P)H/FAD wird ermittelt, ob eine vermehrte Oxidation dieser Redoxäquivalente unter OM verzeichnet wird. Zur Objektivierung, wie sich die Effekte von OM bei  $\beta$ -adrenerger Co-Stimulation entwickeln, wird eine Versuchsreihe mit dem  $\beta$ -adrenergen Agonisten Isoprenalin ergänzt. Um auch hier einen Einfluss auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt messen zu können, schlossen wir die Versuchsreihe mit Untersuchungen des  $\text{Ca}^{2+}$ -Flusses.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Material**

##### **3.1.1 Versuchstiere**

Bei den Versuchstieren der Omecamtiv Mecarbil- und Levosimendan-Messreihen handelte es sich um weibliche Hartley Meerschweinchen vom Züchter Charles River. Bei Erhalt der Tiere hatten diese ein Gewicht von 200-250 g. Die physiologische HF von Meerschweinchen liegt zwischen 150-300 Schläge/min, der Aufbau der Myofilamente, die PDE3-Aktivität, sowie der Calciumhaushalt (mit mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Mikrodomänen) sind den humanen Herzmuskelzellen ähnlicher als denen von Mäusen oder Ratten, weshalb sie an dieser Stelle als Versuchstiere ausgewählt wurden. Alle Versuche sind unter Genehmigung der Tierschutzkommission der medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes, des Landesamtes für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz Abteilung „Lebensmittel und Veterinärwesen“ nach §8 Abs. 1 Tierschutzgesetzes (TiSchG) des Saarlandes und der Bundesrepublik Deutschland abgelaufen. Die Meerschweine wurden in Käfigen mit maximal 4 Tieren bei Raumtemperatur gehalten und konnten ihren physiologischen Tages- Nacht- und Fressrhythmus beibehalten.

##### **3.1.2 Verwendete Materialien**

###### **3.1.2.1 Verwendete Substanzen zur Zellisolation und Zellmessung**

###### **3.1.2.1.1 Normal-Tyrode (NT) Lösung ( $\text{Ca}^{2+}$ -frei)**

Die Lösung wurde bei Raumtemperatur auf einen pH-Wert von 7.46 eingestellt und mit NaOH, bzw. HCl gepuffert.

Stoff	MG [g/mol]	Konzentration [mmol/L]	Menge in 1 L destilliertes Wasser [mg]	Hersteller
Natriumchlorid (NaCl)	58.44	130	7597.2	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	74.55	5	372.8	Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	203.31	1	203.3	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natrium-Hepes (C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> NaO <sub>4</sub> S)	260.30	10	2603.0	Amresco, Solon, Ohio, USA
Natrium-Pyruvat (C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>3</sub> )	110.02	2	220.0	AppliChem GmbH, Darmstadt
L-(+)-Ascorbinsäure (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> )	176.12	0.3	52.8	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
D-(+)-Glukose (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	180.16	10	1801.6	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<b>Zur pH- Einstellung:</b>				
Natriumhydroxid (NaOH)	39.99	1 M	Richtet sich nach pH	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Chlorwasserstoff (HCl)	36.46	1 M	Richtet sich nach pH	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Tabelle 5: NT-Tyrode Lösung (Ca<sup>2+</sup> frei)

### 3.1.2.1.2 High-K<sup>+</sup> Tyrode Lösung

Die Lösung wurde bei Raumtemperatur auf einen pH von 7.54 eingestellt und mit KOH, bzw. HCl gepuffert.

Stoff	MG [g/mol]	Molarität [mmol/L]	Menge auf 130ml dest. Wasser [mg]	Hersteller
Kalium-Glutamat (KC <sub>5</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>4</sub> )	202.23	120	3155.88	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kaliumchlorid (KCl)	74.55	25	242.32	Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	203.31	1	26.416	Merck KGaA, Darmstadt
Hepes C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	238.30	10	309.816	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natrium-Pyruvat C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>3</sub>	110.02	2	28.6	AppliChem GmbH, Darmstadt
L-(+)-Ascorbinsäure C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	176.12	0.3	6.9	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
D-(+)-Glukose C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	180.16	10	234.21	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<b>Zur pH-Einstellung:</b>				
Kaliumhydroxid KOH	56.11	1 mol/L	Richtet sich nach pH	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Chlorwasserstoff HCl	36.46	1 mol/L	Richtet sich nach pH	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Tabelle 6: High K<sup>+</sup>-Tyrode Lösung

### 3.1.2.1.3 Lösungen für die Zellisolation beim Meerschwein

#### 1. Spüllösung 1

Stoff	MG [g/mol]	Hersteller	Menge
NT-Ca <sup>2+</sup> -free	s.o.	s.o.	110 ml
Ethylenglycol-bis(β-aminoethylether) N, N, N', N'-tetraessigsäure Tetranatriumsalz (EGTA)	380.35	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	11 µl [50 µM]

Tabelle 7: Spüllösung 1 Meerschwein

#### 2. Verdauungslösung

Stoff	MG [g/mol]	Molarität [mmol/L]	Hersteller	Menge
NT-Ca <sup>2+</sup> -free	s.o.	s.o.	s.o.	40 ml
Calciumchlorid CaCl <sub>2</sub>	110.98	1.0	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	4 µl
Kollagenase Typ 2 (265 Units/ml) CLS 2	/	/	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA	22.5 mg
Protease, Type XIV, (≥ 3,5 U/mg)	/	/	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	4.3 mg

Tabelle 8: Verdauungslösung Meerschweinchen

### 3. Spüllösung 2

Stoff	Menge
High K <sup>+</sup> Tyrode	130 ml
Ethylenglycol-bis (β-aminoethylether) N, N, N', N'-tetraessigsäure Tetranatriumsalz (EGTA)	13 µl [50 µM]

Tabelle 9: Spüllösung 2 Meerschweinchen

#### 3.1.2.1.4 Medium für Meerschwein-Zellen

Stoff	Konzentration	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	93 %	Life technologies, Thermo Fisher Scientific, Paisley, UK
Penicillin G (10.000 Units) / Streptomycinsulfat	1 %	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
FCS (Fetales-Kälber-Serum)	5 %	
Hepes C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S (500 µl auf 50ml Falcon)	1 % [10 mM]	

Tabelle 10: DMEM

#### 3.1.2.1.5 Lösungen bei der Zellmessung

Im Folgenden sind alle Stoffe aufgezählt, die bei der Myozytenmessung zur Anwendung kommen.

Der NT werden im Vorhinein zur Messung der Meerschweinzellen auf 1000ml Lösung 2ml CaCl<sub>2</sub> hinzugefügt, damit eine 2mmol/L Ca<sup>2+</sup>-Konzentration entsteht.

Stoff	MG [g/mol]	Menge auf 50ml NT	Hersteller
Dimethylsulfoxid (DMSO) C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS	78.13	Variiert	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
(-)-Blebbistatin C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	292.33	Variiert	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
EMD (MSC1066162a)	425.51	Variiert	Merck KGaA, Darmstadt
Omecamtiv Mecarbil C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> FN <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	401.43	Variiert	Selleck Chemicals, Houston, USA
Levosimendan C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> N <sub>6</sub> O	280 Da	Variiert	LKT Laboratories, Inc., St. Paul, MN, USA
Isoprenalin Hydrochlorid C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>3</sub> ·HCl	247.72	Variiert	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Carbonyl cyanide 4-(trifluoro- methoxy)phenylhydrazone (FCCP)	254.17	5µl [5µM]	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Indo-1, AM	1009.93	Vorinkubation: 1.0-5.0 µL/ 1 ml für 10-20 min. RT im Medium + Mediumwechsel	Molekular Probes, by lifetechnologie s, Eugene, Oregon, USA
Tetramethylrhodamine-methyl- ester (TMRM)	500.93	Vorinkubation: 0.25 µL/1ml für 5- 10 min. in NT	Invitrogen, Karlsruhe
Dichlorodihydrofluoreszindiazetat	577.80	Vorinkubation:	

(H <sub>2</sub> DCFDA)		0.75 µl - 4 µl/ 1 ml für 20 min. in NT + Mediumwechsel	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>			Merck, Darmstadt
Natrium-Cyanid (CN)	49.01	10 mg [4,1 mM]	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Laminin	Etwa 850 kDa	/	Roche Diagnostik GmbH, Mannheim
Immersionsöl	/	/	AppliChem GmbH, Darmstadt

Tabelle 11: Lösungen bei der Zellmessung

### 3.1.2.1.6 Weitere Substanzen

Stoff	Verwendung	Hersteller
Wasser, vollentsalzt und destilliert	Herstellung von Lösungen	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Rimadyl-Lösung, 1 ml: -50 mg Carprofen -10 mg Benzylalkohol	Analgesie; i.v. und s.c. Injektion: -Injektionsdosis 1:5 mit NaCl verdünnt -Injektion 0.3 ml Lösung	Pfizer GmbH, Berlin, Deutschland
Natrium-Heparin 25.000 I.E./ 5ml	Thromboseprophylaxe: -Injektionsdosis 0.5 ml	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Isofluran	Hypnose; Muskelrelaxation, Inhalationsnarkose	Baxter, Unterschleißheim
Softasept N	Hautdesinfektionsmittel	B.Braun

		Melsungen AG, Melsungen
Ethanol, 1 % Methyl Ethyl	Isolation	Merck KGaA, Darmstadt
Sauerstoff	Begasen von Lösungen	Praxair, Düsseldorf

**Tabelle 12: Weitere Substanzen**

### 3.1.2.2 Instrumentarium und Geräte zur Lösungsansetzung

Instrumentarium/ Geräte	Hersteller
Pipetten 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl, 5 µl	Eppendorf AG, Hamburg Gilson, Villiers-Le-Bel, Frankreich
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Feinwaage, ABS 120-4	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Gefrierschrank	Liebherr, Bulle, Schweiz
Kühlschrank	Liebherr, Bulle, Schweiz
Magnetrührer CAT 6.1	Ingenieurbüro CAT, M. Zipperer GmbH, Staufen
pH Elektrode SenTix 22	WTW, Weilheim
pH-Meter, Eutech Instruments, pH 510	VWR, Darmstadt
Vortex Mixer, SN 41119030	Labnet International, NJ, USA
Falcon, Blue Max, 15 ml und 50 ml Polypropylene Conial Tube	Becton Dickinson, N.J., USA
Reagiergefäße 0.5 ml, 1 ml, 1.5 ml, 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht

**Tabelle 13: Instrumentarium und Geräte zur Lösungsansetzung**

### 3.1.2.3 Narkosesystem zur Betäubung der Versuchstiere

Als Narkosemittel wurde das volatile Anästhetikum Isofluran verwendet, das zusätzlich zu seiner hypnotischen auch eine muskelrelaxierende Wirkung hat (Tabelle 12).

Aufbau des Narkosesystems	Hersteller
Vaporizer Key Fill Isoflurane	Hugo Sachs Elektronik-Harvard-Apparatur GmbH, March-Hugstetten
Fluovac Gas Evacuation System	
Oxygen Flowmeter (Fluss 0.5 ml/min mit 5 % Isofluran und 95 % O <sub>2</sub> )	
Keyfill Adapter	
Tube Adapter to Fluosorber	

Tabelle 14: Aufbau des Narkosesystems

### 3.1.2.4 Instrumentarium und Geräte zur Präparation und Isolation

Instrumentarium/ Geräte	Hersteller
Pinzette-Dumont-7	Fine Science Tools GmbH, Schweiz
Schere 14510-17	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Feinschere INOX	Bochem Instrumente GmbH, Weilburg
Klemme EF016R	Aesculap, B.Braun Melsungen AG, Melsungen
MoliNea plus L, Unterlagen	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Aortenkanüle 1mm Durchmesser	Hugo Sachs Elektronik - Harvard Apparatus GmbH, March- Hugstetten
Langendorff- Perfusionsanlage	
Lauda Ecoline Staredition Wärmethermostat mit Edelstahlbad und Variopumpe	Lauda Dr. R. Wobser, Lauda-Königshofen
Reglo Digital mikroprozessorgesteuerte Dosierpumpe	Ismatec, Wertheim-Mondfeld
Ethicon Mersilene Polyesterfaden 5-0	Johnson & Johnson Intl., St-Stevens-Woluwe, Belgien
Spritzen 10 ml	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Handschuhe	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Brutschrank (37 °C, 5 Vol % CO <sub>2</sub> ), Heraeus	Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe
Wärmeschrank WTC	Binder GmbH, Tuttlingen
Binokular, SMZ645	Nikon, Düsseldorf

Tabelle 15: Instrumentarium und Geräte zur Präparation und Isolation

### 3.1.2.5 Anlage zur Fluoreszenzmessung

Komponenten	Hersteller
Computer mit Monitor und Tastatur	Firma Dell
CFA Option D: Dual Emission option for CFA300	IonOptix, Dublin, Irland
CFA300 Cell framing adapter	
FSI700 Fluorescence system interface	
MCS100 Myo-Cam-S Digital Variable filed rate CCD	
MUS200 $\mu$ Step stand alone filter wheel and controller	
PMT400 Photomultiplier sub-system	
PTV100 PMT to Voltage Adapter	
Model TC-324B Heater Controller, Single Channel	
SARCACQ SarcLen Messeinheit für Sarkomerlänge (Software)	
IONWZ IonWizard Core + Analysis (Software)	
Mikroskop Nikon Ti-S/L100	
Constant Current / Voltage Isolated Stimulators (DS2A / DS3)	Warner Instruments
Stimulus Isolation Unit (SIU-102)	
Filter und Spiegel	Chroma Technology GmbH, Fürstfeldbruck
Xenon short arc lamp -75XE (75W)	Ushio Inc., Tokyo
Vakuumpumpe SP302SA	Schwarzer Precision Essen

Tabelle 16: Komponenten der Fluoreszenzmessanlage

In der folgenden Tabelle sind die benutzten Spiegel und Filter zu den verschiedenen Versuchsprotokollen aufgezählt.

Spiegel	Bezeichnung	Spiegel [nm]	Transmission [nm]	Farbstoffe	Ort
T660LPXR	T660LPXR		>660	Durchlicht	Mikroskop
<b>Strahlenleiter im Mikroskop</b>					
365/535	C120299	340/540	405/485/>600	Indo/TRM	Mikroskop (Filter1)
89017bs	120298	340/490	435/>505	NADH/FA D/DCF	Mikroskop (Filter 2)
<b>Strahlenteiler in den Cubes vor der Kamera und den PMT's</b>					
650DCXR	650DCXR	<650	>650	Durchlicht	Vor der Kamera
490DCLP	490DCLP	<490	>490	NADH/FA DH	PMT Spiegel
Reiner Spiegel	Reiner Spiegel	Alles		NADH/FA DH	PMT Spiegel
440DCLP	440DCLP	>440	>440	Indo/TMR M	PMT Spiegel
515DCXR	515DCXR	<515	>515	Indo/TMR M	PMT Spiegel
<b>Filter vor den PMT's</b>					
D435/35x	D435/35x	/	435±17.5	NADH	Vorm PMT
D525/30x	D525/30x	/	525±15	FADH	Vorm PMT
D405/30x	D405/30x	/	405±15	Indo	Vorm PMT
D485/30x	D485/30x	/	485±15	Indo	Vorm PMT
D605/55x	D605/55x	/	605±27.5	TMRM	Vorm PMT
<b>Anregungsfilter hinter der Lampe</b>					
D340/12x	D340/12x	/	340±6	NADH/Ind	Filterrand

				o	1
S490/20x	S490/20x	/	490±10	FADH	Filterrand 2
D540/25x	D540/25x	/	540±12.5	TMRM	Filterrand 3

**Tabelle 17: Filter und Spiegel der Fluoreszenzmessanlage**

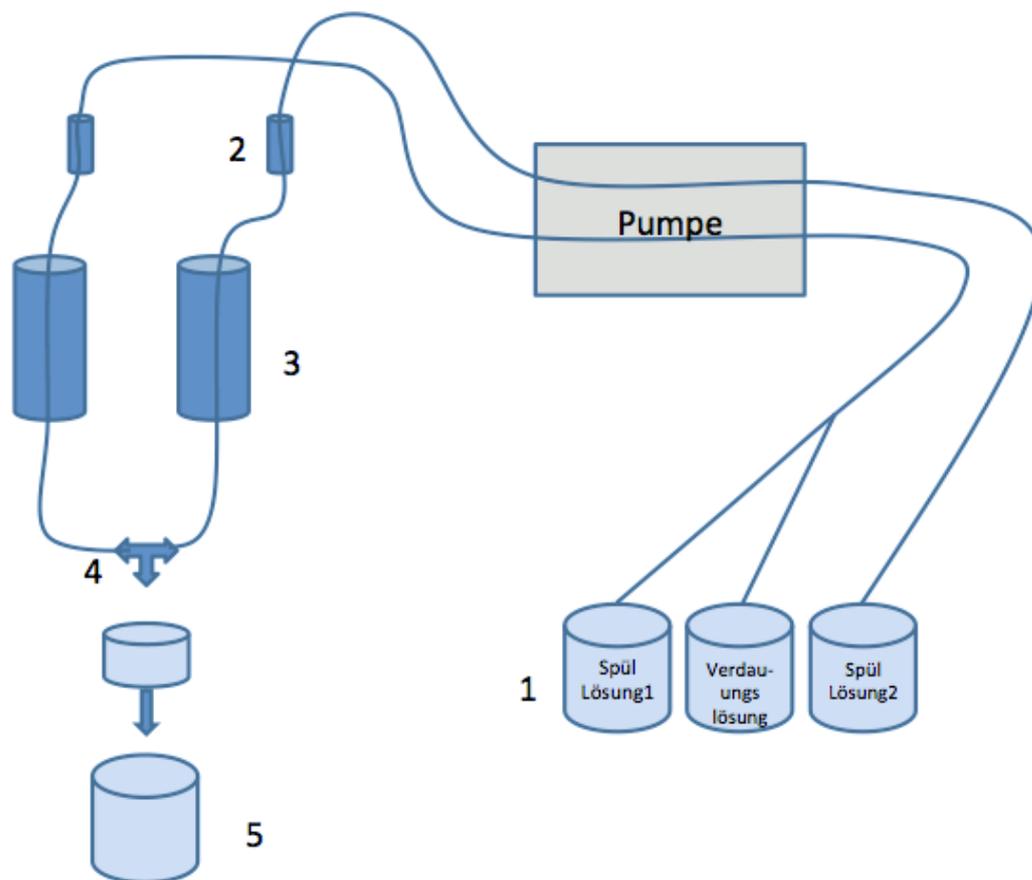
Des Weiteren sind zusätzliche Verbrauchsmaterialien aufgeführt:

Materialien	Hersteller
Deckglässchen	VWR International, Darmstadt
Baysilone-Paste	GE Bayer Silicones, Leverkusen
Discofix C Dreiwegehahn	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Exadrop Tropfenregler mit Infusionsgerät	
Original Perfusor Spritze 50 ml	

**Tabelle 18: Weitere Verbrauchsmaterialien der Zellmessung**

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Myozytenisolation



**Abbildung 17: Schematische Übersicht der Langendorff-Isolationsanlage mit:**

- 1: Lösungen für die Kardiomyozytenisolation, Begasung mit Sauerstoff (nicht im Bild)
- 2: Tropfenfänger mit Luftventil
- 3: Temperaturangleichung der Lösungen durch (im Bild nicht sichtbar) Schlangenhalskühler
- 4: 3-Wege-Hahn mit nach unten folgender Herzaufhängung
- 5: Auffangbehälter für durchgelaufene Flüssigkeiten

Vorbereitung:

Für die Kardiomyozytenisolation des Meerschweinchens werden anfangs die Lösungen aus Tabelle 7 bis Tabelle 9 hergestellt: 110 ml Spüllösung 1, 40 ml Verdauungslösung und 130 ml Spüllösung 2.

Das Wasserbad der Langendorff-Perfusionsanlage ist einzuschalten (37 °C), 50 ml DMEM+Hepes (Tabelle 10) sind in einem beschrifteten Reaktionsgefäß hineinzustellen und die Leitungen der Anlage sind mit destilliertem Wasser bei einer Flussrate von 8.2 ml/min. durchzuspülen (Überprüfung mit einem 15 ml Reaktionsgefäß).

Das Material, eine Operationsmatte für die Herzextraktion, 5 Klebestreifen, Handschuhe, Präparierbesteck, Müllbeutel und Faden mit Knotenvorbereitung sind im Vorhinein bereitzulegen. Analgesie und Heparin sind auf Spritzen aufzuziehen. Ein kleines Becherglas und eine kleine Petrischale werden mit NT befüllt und auf Eis gestellt. Die Glasfritten müssen an die vorgesehenen Schläuche montiert werden. 2 50 ml Reaktionsgefäße werden wie folgt beschriftet: „Transport“ und „Bitte stehen lassen“. Letzteres wird noch mit einem Trichter aus Filtermembran versehen.

Die Sauerstoffflasche wird nun aufgedreht. Die Spüllösung 1 wird mit der großen Fritte und die Verdauungslösung mit der kleinen Fritte mit 1 Bar begast. Im nächsten Schritt wird die Anlage mit der begasten Spüllösung 1 eingespült und die restliche, im System vorhandene Luft mit einer Spritze über das Luftventil aus dem Tropfenfänger gezogen. Der Füllstand muss über der Ablauföffnung so eingestellt werden, dass keine Luftblasen hineingelangen können. Die letzten vorhandenen Luftblasen werden mit Hilfe einer Spritze und aufgesetzter Kanüle aus dem System gezogen.

#### Präparation:

Es sind Handschuhe zu tragen. Das Meerschweinchen sollte mindestens 30 Minuten zur Ruhe kommen, bevor es aus dem Käfig genommen wird. Man lässt das Tier zur Beruhigung einige Minuten auf dem Arm sitzen, dabei sind laute Geräusche zu vermeiden. Das Meerschweinchen wird nun auf den Rücken gedreht, und so gehalten, dass es sich mit seinen Hinterbeinen am Oberkörper der haltenden Person abstützen kann. Dann wird die Analgesie (0,3 ml) und das Heparin (0,5 ml) s.c. injiziert.

Nach setzen in die Narkosekammer, wird die Isofluran-Anästhesie eingeleitet und das Tier beobachtet. Sobald es sediert und wieder herausgenommen werden kann, wird die Inhalationsmaske für Kleintiere über die Nase gestülpt. Das Meerschwein wird nun an den Extremitäten mithilfe des Klebebands befestigt, soweit distal wie möglich. Zur Überprüfung der Narkosetiefe wird der Zwischenzehenreflex mit einer großen Klemme an den Füßen getestet. Sobald keine Reflexantwort mehr vorhanden ist, kann mit der Herzextraktion begonnen werden. Die Bauchdecke wird, nach ausreichender Desinfektion mittels Softasept N, mit einer Klemme angehoben und mit einer großen Präparierschere V-förmig vom Bauchnabel bis zu den Zwerchfellrändern eingeschnitten, sodass das Darpaket freiliegt. Mit einer Hand die Bauchdecke festhalten und mit der Klemme das Sternum fassen. Die Klemme schließen. Im nächsten Schritt müssen die Rippen mit der Schere durchtrennt werden, damit das Zwerchfell erst dargestellt und dann entlang des Rippenbogens aufgeschnitten werden kann. Die Klemme kann nun über dem Kopf des Tieres abgelegt werden. Die große

Schere wird weggelegt. Im nächsten Schritt das freiliegende Herz mit drei Fingern fassen und mit der kleinen Schere oberhalb der Aortenwurzel heraustrennen. Dieses wird nun in das Becherglas mit der eiskalten NT-Lösung gegeben. Die Handschuhe sind zu wechseln. Anschließend wird das Herz mit einer Pinzette in die Petrischale mit eiskalter NT-Lösung gelegt. Lungenanteile, Fett- und Bindegewebe über den Rand der Schale ziehen und abschneiden. Der Herzbeutel ist vollständig zu entfernen und der Flow der Isolationsanlage ist anzuschalten. Bei leichtem Druck auf das Herz tritt Blut aus der Aorta, sodass man diese identifizieren kann. Die Aorta vorsichtig mit zwei Pinzetten fassen, das Herz hochheben und auf die dafür vorgesehene Kanüle der Langendorff-Perfusionsanlage ziehen. Nicht zu weit nach oben, damit keine Gewebsverletzungen entstehen. Aorta mit kleiner Klemme fixieren und anschließend mit vorbereitetem Faden doppelt festknoten (Abbildung 18).



**Abbildung 18: Meerschweinchenherz aufgehängt in der Langendorff-Perfusionsanlage**

Isolation:

Ein Timer mit 3 min Laufzeit ist zu starten. Durch Spülung der Koronargefäße sollte sich das Herz nun heller färben, ist dies nicht der Fall hat man das falsche Gefäß als Aorta identifiziert. Nach abgelaufenen 3 min ist auf die Verdauungslösung umzustellen. Bis die Verdauung beginnt, vergehen etwa 3 Minuten, dies ist sichtbar anhand dunkler und viskos werdender Tropfen, die vom Herz in den Auffangbehälter fallen. Von hier an beginnt die Verdauzeit von etwa 6 min 30 s, da die Verdauungslösung knapp

bemessen ist, muss sie rezirkuliert werden. Nach diesem Vorgang wird auf die 2. Spüllösung umgestellt. Dieser Vorgang dauert 7 min. Eine Petrischale mit Spüllösung 2 ist unter das Herz zu stellen, das nun unterhalb der Vorhöfe abgeschnitten und in die Lösung gelegt wird. Die Herzkammern sind aufzuschneiden und auf Blutrückstände zu überprüfen die ggf. entfernt werden müssen. Das Herz wird nun in das Transportröhrchen gefüllt und unter der Zellkulturbank zerschnitten. Langsam mit einer Transferpipette aufsaugen und ablassen, um die Zellen voneinander zu lösen. Sobald sich die Lösung deutlich getrübt hat, wird ein Tropfen auf den Deckel einer Petrischale gegeben und unter dem Mikroskop betrachtet, um die Vitalität und Zellmenge zu beurteilen. Eine sichtbare Querstreifung und backsteinförmiges Aussehen sind wünschenswert. Anschließend wird die getrübt Lösung durch den 100 µm Filter und anschließend nochmals durch einen 70 µm Filter in das vorbereitete 50 ml Reaktionsgefäß „Bitte stehen lassen“ gegeben. Der Filter wird entfernt, wenn die Flüssigkeit durchgelaufen ist. Das Gefäß 10-15 min stehen lassen, bis sich ein Pellet gebildet hat. Evtl. müssen die Zellen vom Rand des Gefäßes durch leichtes Aufklopfen auf den Tisch losgelöst werden. Der Überstand ist abzusaugen und in das 37 °C warme Medium aufzunehmen. Die Zellen sind für 30 Minuten in den Wärmeschrank (37 °C und 5 % - CO<sub>2</sub>) zu stellen.

### **3.2.2 Transfer der Myozyten auf das Deckglässchen/ Auf- und Einbau der Messkammer**

Zunächst werden die Deckglässchen mit 5 µL Laminin mittig beschichtet. Nachdem diese getrocknet sind, werden sie in die Messkammer eingebaut. Über die Fixierung des Gläschens mit Silikon an die Kunststoffeinheit der Messkammer, die zwei Platindrähte zur elektrischen Stimulation, eine Zulauföffnung für Lösungen und eine Ablaufkammer zum Absaugen enthält, wird das Glas mit einer Befestigung aus 4 kleinen Schrauben in eine Heiz-Plattform eingebaut, die wiederum Anschlüsse für den IonOptix MyoPacer und den Heat Controller enthält. Vor Versuchsbeginn und im späteren Verlauf wird die Kammer (nach Wechsel des Deckgläschens) wiederholt mit Zellen beladen. Dies geschieht mit einer Transferpipette aus vorher dem Wärmeschrank entnommenen Zellen. Der Vorgang der Zellanheftung auf der Lamininschicht beläuft sich auf etwa 5 min. Der Einbau geschieht wie folgt: Die rundliche Messkammer wird in den dafür ausgesparten Bereich des Fluoreszenzmikroskops unter der Lampe eingesetzt und mit zwei Klipps an der linken und rechten Außenseite befestigt. Der Zulauf und die Absaugung sind in der

Kunststoffeinheit zu fixieren. Die Stimulation ist über zwei Kabel an die Messkammer anzuschließen. Die Heizungsanschlüsse sind oben und unten an der Messkammer anzubringen und im Anschluss ist die Heizung einzuschalten. Während des Heizvorgangs sollte mithilfe der NT-Lösung die Kammer gespült werden, um die Zellen zu schonen.

### 3.2.3 Aufbau der Messanlage und Messablauf

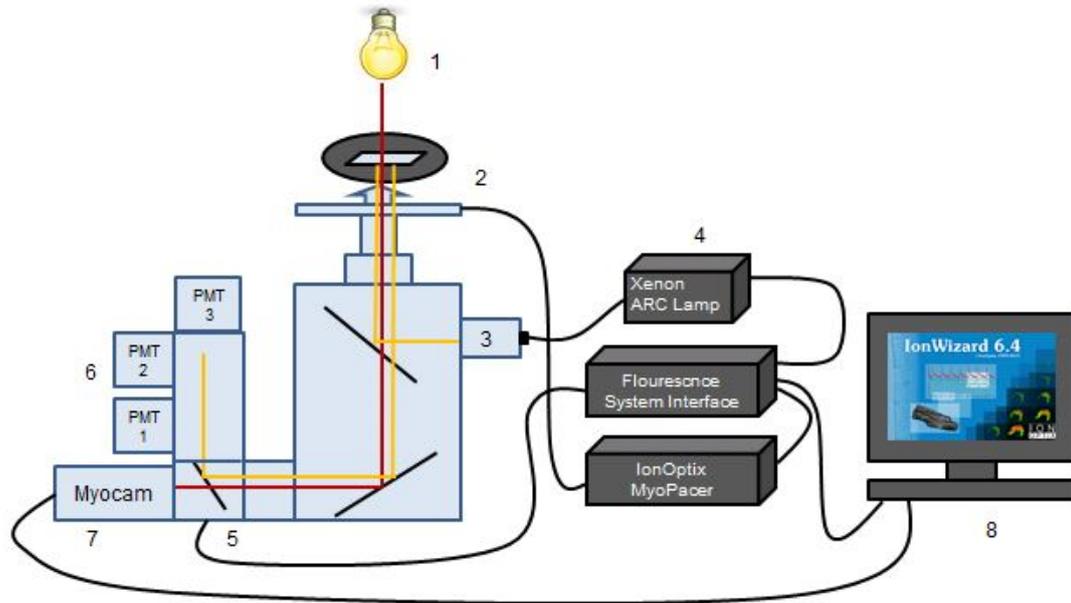
Die vorher mit einem Farbstoff inkubierten (Indo/ TMRM-Messung) oder nativ belassenen Zellen (NAD(P)H/ FAD-Autofluoreszenzmessung) werden mit der Fluoreszenzmessanlage von IonOptix in Bezug auf ihre Sarkomerlängenverkürzung, Autofluoreszenz von NAD(P)H/FAD, ihr mitochondriales Membranpotential und ihren Calciumgehalt im Zytoplasma untersucht. Die Anregungs- und Emissionswellenlängen der Farbstoffe sind in Tabelle 19 dargestellt.

Farbstoff	Substrat	Exzitation 1[nm]	Emission 1[nm]	Emission 2[nm]	Kd
Indo	Ca <sup>2+</sup>	340	405	485	ca.100nM
NAD(P)H	NAD(P)H	340	450	/	/
FADH	FADH	480, max. 450	520	/	/
TMRM	Membran potential	540	605 bzw. 580	/	/
DCF	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	480	520	/	/

**Tabelle 19: Anregungs- und Emissionswellenlängen**

Sämtliche Daten wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop, der IonOptix-Anlage und dem Programm IonWizard 6.4 erhoben.

In Abbildung 19 ist der schematische Aufbau der Messanlage mit IonOptix-System, Fluoreszenzmikroskop, Xenon ARC Lamp und Computer mit Startbildschirm des IonWizard Programms dargestellt. Genauere Herstellerinformationen sind Tabelle 16 zu entnehmen.

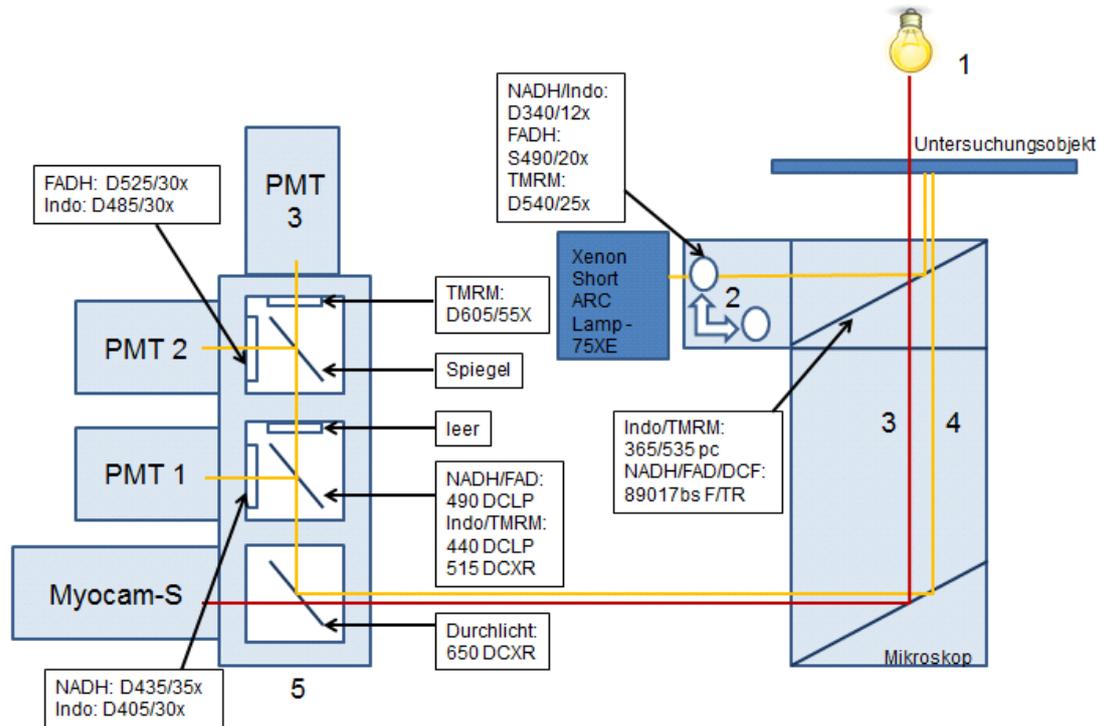


**Abbildung 19: Schematischer Aufbau der IonOptix-Messanlage der Fluoreszenz- und Sarkomerlängenmessung;**

- 1: Lampe mit Filter; rote Linie: Durchlicht
- 2: Zur besseren Darstellung aus der horizontalen Ebene aufgerichtete Messkammer mit eingebauten Deckglässchen und aufgetragenen Myozyten
- 3: Lichtleitereinkoppler am Mikroskopgehäuse
- 4: Xenon ARC Lamp mit IonOptix  $\mu$ Step und Filter Bausatz
- 5: Cell-Frame-Adapter
- 6: Photomultiplier 1-3
- 7: Myocam-S
- 8: Computer mit Programm IonWizard 6.4 von IonOptix

Mittels der Myocam-S werden die in der Kammer ausplattierten Zellen in das Programm IonWizard als Echtzeitbild projiziert, diese Bilder werden zur Messung der Sarkomerlängenverkürzung verwendet. Die Xenon Short ARC Lampe regt den jeweiligen Farbstoff über den Lichtleitereinkoppler am Mikroskopgehäuse über Umleitung mittels Spiegel in der Messkammer an. Durch Reflexion in der Kammer wird der Emissionsstrahl erneut durch Umleitung in den Cell-Frame-Adapter und anschließend in die verschiedenen Photomultiplier (PMTs) projiziert. Durch Einsatz bestimmter, für die zu messenden Farbstoffe spezifischer Spiegel und Filter wird das Signal in den entsprechenden PMTs verstärkt und in eine Spannung umgewandelt. Im nächsten Schritt wird diese Spannung im Fluorescence System Interface umgesetzt und im IonWizard Programm als Fluoreszenzsignal angezeigt.

In Abbildung 20 ist der spezifische Einbau der Spiegel und Filter, je nach zu messender Fluoreszenz dargestellt. Zu sehen ist der schematische Aufbau des Fluoreszenzmikroskops, des Cell-Frame-Adapters, der Myocam-S und der Photomultiplier. Tabellarische Auflistung der unterschiedlichen Messaufbauten siehe auch Tabelle 17.

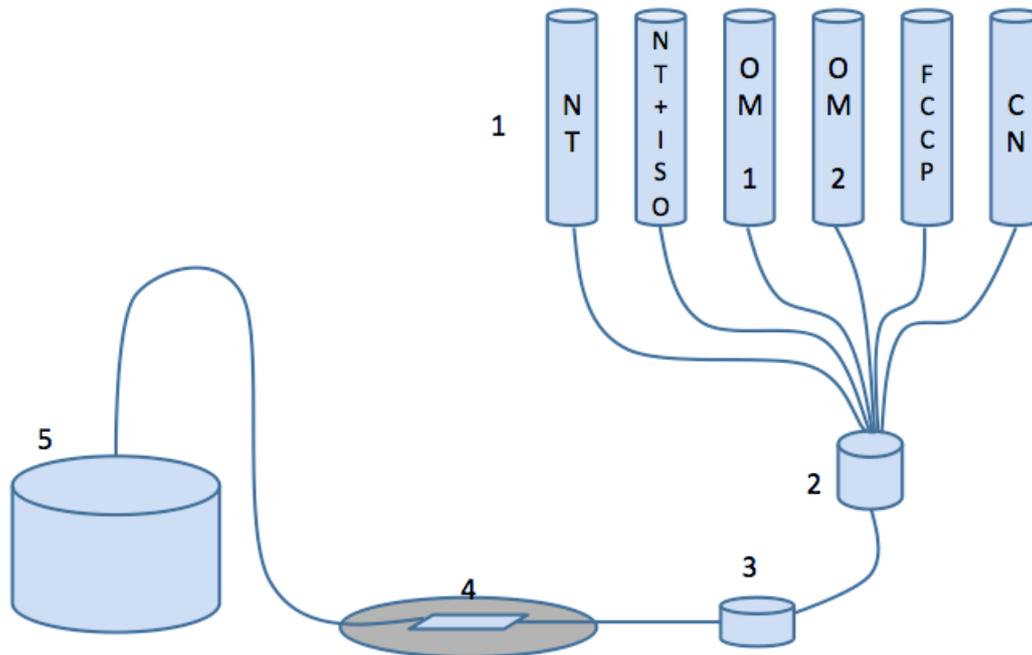


**Abbildung 20: Schematischer Aufbau zur PMT-Einstellung bei Fluoreszenzmessung von NAD(P)H/FADH oder Indo/TMRM (Tabelle 17).**

- 1: Lampe mit Filter
  - 2: Filterrad mit 6 Filtern
  - 3: Durchlicht mit  $\lambda > 660\text{nm}$
  - 4: Anregungs- und Emissionslicht der Farbstoffe
  - 5: Cell-Frame-Adapter und Photomultiplier
- DCLP; Dichroic Long Pass, PC; Polychroic

Messablauf: Nachdem die Messkammer eingebaut, vorgeheizt und die NT-Lösung einspült wurde, ist der IonOptix MyoPacer einzuschalten. Die Stimulationsfrequenz ist je nach geplantem Messprotokoll einzustellen. Die Stimulationsstärke beträgt bis 100 mA. Die Zulaufgeschwindigkeit ist an den Perfusorspritzen zu regulieren.

In der folgenden Abbildung ist der Lösungszulauf, der Anschluss an die Messkammer und die Absaugvorrichtung schematisch dargestellt.



**Abbildung 21: Schematischer Aufbau des Lösungszulaufes, des Kammeranschlusses und der Absaugvorrichtung, mit:**

- 1: Verschiedene Lösungen in 50ml Perfusorspritzen zum Einwaschen während der Messung
- 2: Zusammenführung der Leitungen
- 3: Heizspule zur Erwärmung der Lösungen
- 4: Messkammer mit eingebauter Kunststoffeinheit (hellblau); Zulauf- und Absaugsystem
- 5: Vakuumpumpe zum Absaugen der Lösungen (Tabelle 16)

Am Fluoreszenzmikroskop ist nun eine zur Messung geeignete Zelle herauszusuchen. Morphologisch ist dies an der „Backsteinform“, der regelmäßigen Kontraktion durch die Stimulation, aufgrund von fehlenden Vakuolen im Zytoplasma und einer gut zu erkennenden Myofilamentzeichnung festzumachen. Die Kontraktion sollte zusehends im 90 Grad Winkel zu den Myofilamente verlaufen. Ist eine solche Zelle gefunden, wird manuell auf eine Übertragung mittels der Myocam umgestellt und die Zelle im IonWizard Programm mit Hilfe von entsprechenden Blenden genau eingestellt, damit nur das Emissionslicht der Zelle und nicht auch der Umgebung oder der Nachbarzellen gemessen wird. Da es sich hierbei um eine Fluoreszenzmessung handelt, ist es obligatorisch in einem Dunkellabor zu arbeiten, in dem nur Lichtquellen verwendet werden, die langwelliges Licht mit einer Wellenlänge > 650 nm aussenden (rotes

Licht). Sobald die Zelle entsprechend eingestellt ist und auf Rotlicht umgestellt wurde, sind die PMTs einzuschalten und das IonWizard-Aufzeichnungsprogramm zu starten. Am Anfang aller Messungen steht das Einschlagen der Zelle über 120 s bei NT-Lösung. Im weiteren Verlauf der Protokolle werden verschiedene Lösungen eingewaschen und die Stimulationsfrequenz verändert. In Abschnitt 3.2.4 sind die unterschiedlichen Messprotokolle aufgeführt. Die Kalibrierung ist bei allen NAD(P)H/FADH-Messungen gleich. Die FCCP-Lösung ist über den 3-Wege-Hahn am Fuße der Perfusorspritzen zu öffnen. Die Kammer wird mit FCCP geflutet. Eine vollständige Oxidation der Redoxäquivalente wird abgewartet. Ist ein stabiles Fluoreszenzplateau erreicht, erfolgt die Umstellung auf die Zyanid-Lösung (CN). Hier wird eine vollständige Reduktion der Redoxäquivalente abgewartet, sichtbar an einem entstehenden Fluoreszenzsignalplateau (Abbildung 22, Tabelle 21). Die genaue Wirkung von FCCP und CN wird im Abschnitt 3.2.5 Fluoreszenzfarbstoffe; 1. NAD(P)H/ FAD – Autofluoreszenzen erläutert.

Fluoreszenz	FCCP	CN
NAD(P) <sup>+</sup> / NAD(P)H	NAD(P) <sup>+</sup> 100% NAD(P)H 0%	NAD(P) <sup>+</sup> 0% NAD(P)H 100%
FAD <sup>+</sup> / FADH <sub>2</sub>	FAD <sup>+</sup> 100% FADH <sub>2</sub> 0%	FAD <sup>+</sup> 0% FADH <sub>2</sub> 100%

**Tabelle 20: Übersicht der Fluoreszenzniveaus bei Kalibrierung**

Nach erfolgter Kalibrierung wird von der CN-Lösung wieder auf die NT-Lösung umgestellt. Bei der Messung von Indo/ TMRM ist keine Kalibrierung notwendig.

Am Ende jedes durchgeführten Protokolls wird eine Hintergrundmessung (BG) durchgeführt, indem die gemessene Zelle mit einer Transferpipette weggespült wird und die noch verbliebenden Emissionen aufgezeichnet werden. In der späteren Auswertung werden diese vom Gesamtfluoreszenzsignal jedes Farbstoffes entsprechend subtrahiert (Abbildung 22).

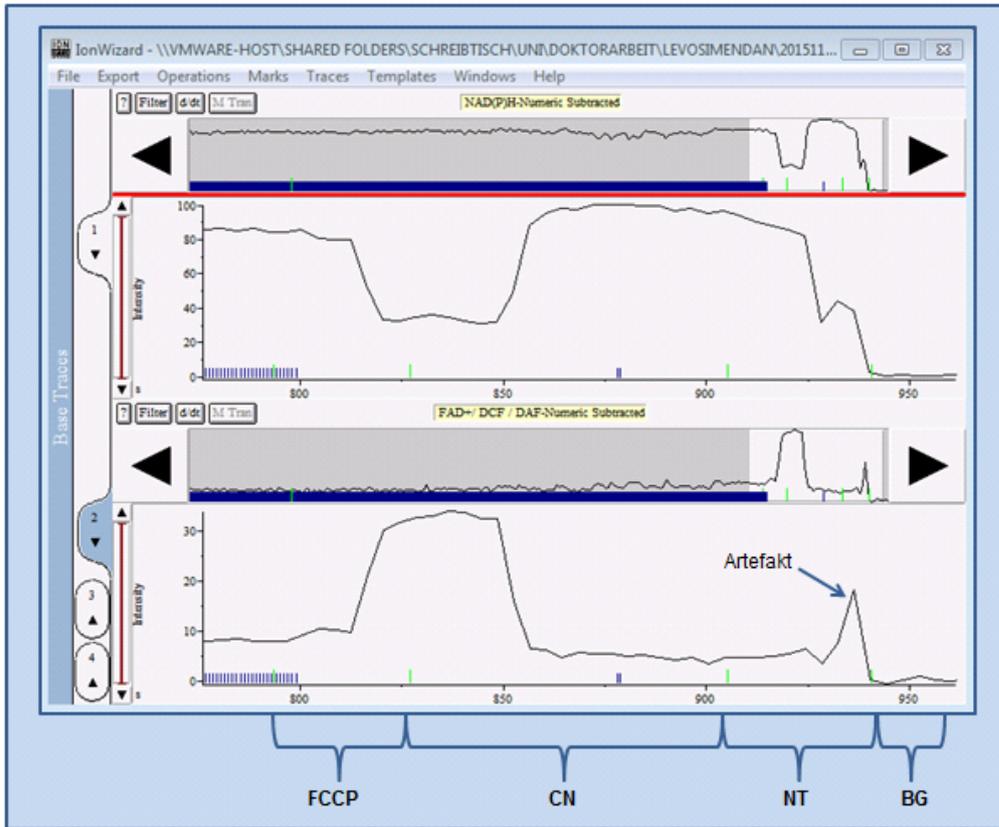


Abbildung 22: Kalibrierung mit anschließender Hintergrundmessung am Beispiel einer IonWizard-Datei. Die obere Kurve stellt das NAD(P)H- und die untere das FADH<sub>2</sub>-Signal dar.

### 3.2.4 Messprotokolle

In Abbildung 22 wird der exemplarische Verlauf einer Fluoreszenzmessung von NAD(P)H/ FAD oder Indo/ TMRM dargestellt. Die blauen Balken stellen das jeweilige Umstellen der Lösungen, bzw. das Umstellen der Stimulationsfrequenz dar.

Übersicht der allgemeinen Messprotokolle der Fluoreszenzen von NADH/FADH; Indo/TMRM; DCF						
Stressprotokoll	0.3Hz	3Hz wenn Iso wirkt 180s			0.3Hz	
NADH/FADH	NT 120s	Iso	NT 60-120s	FCCP	CN	BG
Indo/TMRM	NT 120s	Iso	NT 60-120s	BG		
DCF	NT 120s	Iso	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	BG		

**Tabelle 21: Übersicht der allgemeinen Messprotokolle**

Im Folgenden sind die verschiedenen Messprotokolle der Levosimendan und Omecamtiv Mecarbil Messreihen aufgelistet:

### 1. Levosimendan-Messprotokolle

Die folgenden Protokolle wurden alle, mit Ausnahme des Stressprotokolls (Tabelle 24/ Tabelle 25), bei einer Stimulation von 1Hz gemessen.

1. Protokoll: Levo [0.1µM] [1µM] [10µM];  
NAD(P)H /FAD und Kontraktilität

Levo-Gruppe	Zeitkontrolle-Gruppe
240s NT+DMSO	780s NT+DMSO
180s NT+Levo [0.1µM]	
180s NT+Levo [1µM]	
180s NT+Levo [10µM]	
Kalibrierung	Kalibrierung

**Tabelle 22: Protokoll 1 Levo**

2. Protokoll: Iso [1nM] + Levo [0.1µM] [1µM] [10µM];  
NAD(P)H /FAD und Kontraktilität

Iso+Levo-Gruppe	Iso-Gruppe
120s NT+DMSO	120s NT+DMSO
120s NT+Iso	660s NT+Iso
180s NT+Iso+Levo [0.1µM]	
180s NT+Iso+Levo [1µM]	
180s NT+Iso+Levo [10µM]	
Kalibrierung	Kalibrierung

**Tabelle 23: Protokoll 2 Levo**

3. Protokoll: Stressprotokoll Levo [1µM];  
NAD(P)H /FAD und Kontraktilität

Iso+Levo-Gruppe	Iso-Gruppe
0.3 Hz; 120s NT+DMSO	0.3 Hz; 120s NT+DMSO
0.3 Hz; 120s NT+Iso	0.3 Hz; 240s NT+Iso
0.3 Hz; 120s NT+Iso+ Levo [1µM]	
3 Hz; 180s NT+Iso+Levo [1µM]	3 Hz; 180s NT+Iso
0.3 Hz; 60s NT+Iso+Levo [1µM]	0.3 Hz; 60s NT+Iso
Kalibrierung	Kalibrierung

**Tabelle 24: Protokoll 3 Levo**

4. Protokoll: Stressprotokoll Levo [1µM];  
Indo (Intrazelluläres Calcium) / TMRM (Membranpotential)  
und Kontraktilität

Iso+Levo-Gruppe	Iso-Gruppe
0.3 Hz; 120s NT+DMSO	0.3 Hz; 120s NT+DMSO
0.3 Hz; 120s NT+Iso	0.3 Hz; 240s NT+Iso
0.3 Hz; 120s NT+Iso+ Levo [1µM]	
3 Hz; 180s NT+Iso+Levo [1µM]	3 Hz; 180s NT+Iso
0.3 Hz; 60s NT+Iso+Levo [1µM]	0.3 Hz; 60s NT+Iso

**Tabelle 25: Protokoll 4 Levo**

## 2. Omecamtiv Mecarbil-Messprotokolle

Die folgenden Protokolle wurden alle bei einer Stimulation mit 1Hz durchgeführt.

1. Protokoll: OM [0.01 $\mu$ M] [0.1 $\mu$ M] [1 $\mu$ M];  
NAD(P)H /FADH<sub>2</sub> und Kontraktilität

OM-Gruppe
120s NT+DMSO
300s NT+OM [0.01 $\mu$ M]
300s NT+OM [0.1 $\mu$ M]
300s NT+OM [1 $\mu$ M]
Kalibrierung

**Tabelle 26: Protokoll 1 OM**

2. Protokoll: OM [1 $\mu$ M] [3 $\mu$ M];  
NAD(P)H /FADH<sub>2</sub> und Kontraktilität

OM-Gruppe
120s NT+DMSO
300s NT+OM [1 $\mu$ M]
300s NT+OM [3 $\mu$ M]
Kalibrierung

**Tabelle 27: Protokoll 2 OM**

3. Protokoll: OM [3 $\mu$ M] [10 $\mu$ M];  
NAD(P)H /FADH<sub>2</sub> und Kontraktilität

OM-Gruppe	Zeitkontrolle-Gruppe
120s NT+DMSO	720s NT+DMSO
300s NT+OM [3 $\mu$ M]	
300s NT+OM [10 $\mu$ M]	
Kalibrierung	Kalibrierung

**Tabelle 28: Protokoll 3 OM**

4. Protokoll: OM [10µM];

NAD(P)H /FADH<sub>2</sub> und Kontraktilität

OM-Gruppe
120s NT+DMSO
380s NT+OM [10µM]
Kalibrierung

**Tabelle 29: Protokoll 4 OM**

5. Protokoll: OM [30µM];

NAD(P)H /FADH<sub>2</sub> und Kontraktilität

OM-Gruppe
120s NT+DMSO
300s NT+OM [30µM]
Kalibrierung

**Tabelle 30: Protokoll 5 OM**

6. Protokoll: OM [1µM] [3µM] + Iso [1nM] [30nM];

NAD(P)H /FADH<sub>2</sub> und Kontraktilität

OM+Iso-Gruppe	OM-Gruppe
120s NT+DMSO	240s NT+DMSO
120s NT+Iso	
300s NT+OM [1µM] +Iso [1nM] [30nM]	300s NT+OM [1µM]
300s NT+OM [3µM] +Iso [1nM] [30nM]	300s NT+OM [3µM]
Kalibrierung	Kalibrierung

**Tabelle 31: Protokoll 6 OM**

7. Protokoll: OM [1µM] [3µM] + Iso [1nM] [30nM]:

Indo (IZ Ca<sup>2+</sup>) / TMRM (Membranpotential  $\Delta\Psi_m$ ) und Kontraktivität

OM+Iso-Gruppe	OM-Gruppe
120s NT+DMSO	240s NT+DMSO
120s NT+Iso	
300s NT+OM [1µM] +Iso [1nM] [30nM]	300s NT+OM [1µM]
300s NT+OM [3µM] +Iso [1nM] [30nM]	300s NT+OM [3µM]

Tabelle 32: Protokoll 7 OM

### 3.2.5 Fluoreszenzfarbstoffe

Im folgenden Abschnitt werden die Autofluoreszenzen NAD(P)H/FAD sowie die Farbstoffe Indo, zur Messung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration und des TMRM, zur Messung des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ), näher beschrieben.

#### 1. NAD(P)H/ FAD – Autofluoreszenzen

In Abbildung 23 ist die Atmungskette an der IMM dargestellt. NADH wird von Komplex 1 zu NAD<sup>+</sup> oxidiert und zur Reduktion von NADP<sup>+</sup> zu NADPH benötigt. FAD nimmt bei der Reaktion von Succinat zu Fumarat (Teil des Citratzyklus) erst zwei Protonen auf, gibt diese dann an Komplex 2 und Ubichinon ab. Über die Komplexe 1, 3 und 4 kann so ein Protonengradient zwischen dem Intermembranraum des Mitochondriums und der Mitochondrien-Matrix aufgebaut werden, der über die ATP-Synthase abgebaut und zur Energieproduktion genutzt wird. Des Weiteren wird reduziertes NADPH genutzt, um mitochondrialen Stress zu mindern.

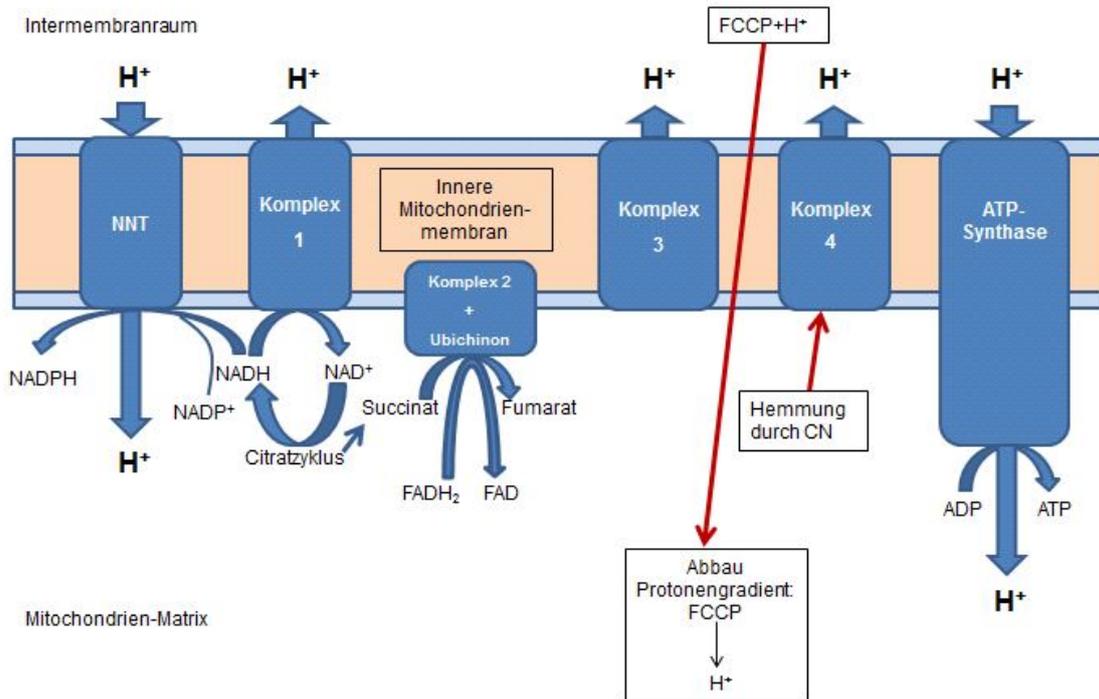


Abbildung 23: Vereinfachte Darstellung der Atmungskette

In den Messungen wurde NAD(P)H und FAD als Autofluoreszenz verwendet, um einen Rückschluss auf die metabolische Reaktion der Myozyten auf die jeweils eingewaschenen Lösungen ziehen zu können. Angeregt wird die NAD(P)H Fluoreszenz bei einer Wellenlänge (im Folgenden nur noch  $\lambda$ ) von  $\lambda = 340\text{nm}$ . Seine maximale Emission liegt bei  $\lambda = 450\text{nm}$ . Die Autofluoreszenz FAD wird bei etwa  $\lambda = 480\text{nm}$  angeregt (obwohl sein Maximum eigentlich bei  $\lambda = 450\text{nm}$  liegt, dies kann technisch allerdings nicht verwendet werden) und emittiert bei etwa  $\lambda = 520\text{nm}$  maximal. Erstellt man einen Quotienten (Ratio) aus der NAD(P)H-Emission/ FAD-Emission, kann man genauere Aussagen über den Oxidations-, bzw. Reduktionsstatus der Zelle treffen (Redoxstatus) und man reduziert zusätzlich Bewegungsartefakte. Eine Erhöhung der metabolischen Aktivität der Zelle, also einem vermehrten Verbrauch der Autofluoreszenzen, sowie eine Verringerung der metabolischen Leistung sind über die Ratio einzuschätzen.

In Abbildung 23 sind zusätzlich der Atmungskettenentkoppler FCCP, sowie der Atmungskettenhemmer Zyanid (CN) zu sehen. FCCP ist ein Ionophor, ein Molekül, das Ionen durch eine Membran transportiert. Es diffundiert nach dem Einwaschen in den Intermembranraum des Mitochondriums und wird dort reduziert. So gelangt es durch

die IMM. In der Matrix gibt es sein Proton wieder ab. Der Protonengradient wird abgebaut und die ATP-Synthase kann kein weiteres ATP herstellen. Ebenso kann kein weiteres  $\text{NADP}^+$  reduziert werden,  $\text{NADH}$  wird also vollständig zu  $\text{NAD}^+$  oxidiert.  $\text{FADH}_2$  gibt seine Protonen vollständig ab (Tabelle 20):  $\text{NAD(P)H}$  0%;  $\text{NAD}^+$  100%;  $\text{FADH}_2$  0%;  $\text{FAD}$  100%. Durch Hemmung von Komplex 4 durch Zyanid kann kein weiteres ATP entstehen, die sich ansammelnden Elektronen können nicht mehr auf  $\text{O}_2$  übertragen werden, die Atmungskette steht still. Der Effekt auf die Fluoreszenz ist gegensätzlich, da weiterhin der Protonengradient genutzt werden kann, um  $\text{NADP}^+$  zu reduzieren,  $\text{FADH}_2$  kann seine Protonen nicht mehr abgeben, da Ubichinol gesättigt ist:  $\text{NAD(P)H}$  100%;  $\text{NAD}^+$  0%;  $\text{FADH}_2$  100%;  $\text{FAD}$  0%. Dieser Effekt wird genutzt, um bei der Auswertung der Daten eine Kalibrierung durchführen zu können.  $\text{NAD(P)H}$  fluoresziert stärker als  $\text{NAD(P)}^+$  und  $\text{FAD}$  (genau umgekehrt) stärker als  $\text{FADH}_2$ . Daher verhalten sich die beiden Floreszenzen bei Reduktion und Oxidation jeweils entgegengesetzt.

## 2. Indo-Fluoreszenz

Bei dem Farbstoff Indo-1, AM (Indo) handelt es sich um eine ratiometrische Substanz, mit der die Zellen vorinkubiert werden müssen. Hierzu wird 1  $\mu\text{l}$  Indo-Lösung (4,95  $\mu\text{mol/L}$ ), das vorher in DMSO gelöst wurde, auf 1 ml Zellsuspension gegeben. Gesamtdauer der Inkubation sind 15 min. Die letzten 3 min lässt man die Zellen sedimentieren. Nach Absaugen des Überstandes wird das Sediment mit NT wieder auf 1 ml aufgefüllt. Diese Zellsuspension wird ausplattiert. Indo gelangt als Acetoxymethylester (AM) in die Zelle. Im Zytosol wird die AM-Gruppe abgespalten, der Farbstoff kann die Zelle nicht mehr verlassen. Die Anregungswellenlänge liegt bei  $\lambda = 338$  nm. Indo kann im Zytosol  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen binden. Ist dies der Fall, dann liegt das Emissionsmaximum bei  $\lambda = 405$  nm. Das ungebundene Indo hingegen emittiert maximal bei  $\lambda = 485$  nm. Eine Ratio-Bildung aus gebundenem und ungebundenem Indo gibt Aufschluss über den Calciumhaushalt der Zelle. Gleichzeitig mit der Indo-Fluoreszenzmessung wird auch das mitochondriale Membranpotential  $\Delta\Psi_m$  mittels TMRM gemessen.

### 3. TMRM-Fluoreszenz

Die Fluoreszenz von Tetramethylrhodaminmethylester (TMRM) kann die Zellmembran sowie die mitochondriale Membran überwinden, ohne die Zelle zu beschädigen. Vor der Ausplattierung ist ebenso eine Inkubation der Zellen mit dem Farbstoff nötig. Hierzu wird 0.25 µl des 0.025 µmol/L TMRMs, das in NT gelöst wurde, zu 1 ml Zellsuspension gegeben. Die Inkubation dauert 5-10 min, wovon die letzten 3 min zur Sedimentbildung genutzt werden. Der Überstand ist abzusaugen und das Sediment wiederum mit NT auf 1 ml aufzufüllen. TMRM ist positiv geladen, also TMRM<sup>+</sup>, und akkumuliert somit bevorzugt in den negativ geladenen Mitochondrien. Die Anregungswellenlänge liegt bei  $\lambda = 540\text{nm}$  und das Emissionsmaximum bei 605 nm. Wir quantifizieren die absolute Menge der Fluoreszenz und können somit Rückschlüsse auf das intra- und extramitochondrial vorhandene TMRM und damit Rückschlüsse auf das mitochondriale Membranpotential ( $\Delta\Psi_m$ ) ziehen. Ist der Protonengradient durch die Atmungskette sehr groß, so ist das Membranpotential größer, da weniger TMRM ins Mitochondrium diffundiert.

#### 3.2.6 Auswertung der Messergebnisse

Die Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mittels Microsoft Excel und IonWizard 6.4 von IonOptix. Die statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe von GraphPad Prism durchgeführt. Nach Beenden eines Messtages wurden die Daten stets über ein Speichermedium auf einen anderen Computer überführt, auf dem die oben aufgeführten Programme installiert sind.

#### 1. Sarkomerverkürzung

Die von IonWizard während des Messvorgangs erhobene Datei ist zur Auswertung der Sarkomerverkürzung zunächst mit IonWizard zu öffnen. Der Reiter Zellverkürzung ist auszuwählen, während die Fluoreszenzsignal- Fenster geschlossen werden. Man erstellt sogenannte Traces, die im Schnitt die letzten 10 stimulierten Zellverkürzungen vor Umstellung auf die nächste Lösung eines beliebigen Protokolls erfassen. Aus diesen Daten berechnet das Programm eine durchschnittliche Sarkomerverkürzung, die als Graf dargestellt wird. Nach Festlegung auf einen Transienten, der die Grenzen

des auszuwertenden Bereichs des Grafen beschreibt, wird eine Tabelle mit berechneten Werten angezeigt:

<b>Bezeichnung</b>	<b>Beschreibung</b>
Zeitpunkt 0 (t0)	Wert zum Zeitpunkt 0
Baseline	Ausgangslänge der Zelle (diastolische Zelllänge)
Departure Velocity	Verkürzungsgeschwindigkeit
Departure Velocity t (Time to peak)	Zeitpunkt der maximalen Verkürzungsgeschwindigkeit (TTP)
Peak	Verkürzungsmaximum (systolische Zelllänge)
Return Velocity	Relaxationsgeschwindigkeit (RT)
Return Velocity t	Zeitpunkt der maximalen Relaxationsgeschwindigkeit
Time to peak 50%	Zeit bis zum Erreichen der Hälfte der minimalen Zelllänge (TTP)
Time to baseline 50% + 90%	Zeit bis zum Erreichen der Hälfte, bzw. 90% der Baseline nach Stimulation
Exponential fit	Berechnete Tau-Funktion von Peak bis zur Baseline nach Stimulation

**Tabelle 33: Übersicht der Kontraktilitätsauswertung**

Diese Tabelle ist zu kopieren und in eine Excel Datei zu überführen, die entsprechend beschriftet ist. So wird mit allen Abschnitten eines Protokolls verfahren, bis alle vorhandenen Zellen ausgewertet wurden. Daraufhin wird die entstandene Tabelle entsprechend sortiert, um mit GraphPad Prism eine Statistik erstellen zu können (s.u).

## 2. Fluoreszenz

Die von IonWizard während des Messvorgangs erstellte Datei ist mit IonWizard zu öffnen. Die Tabs der Fluoreszenzsignale werden in den Vordergrund gestellt, während der Zellverkürzungs-Tab geschlossen wird. Im ersten Schritt wird die Hintergrundfluoreszenz, die am Ende eines Protokolls gemessen wird, eliminiert. Im zweiten Schritt werden die Daten in eine eigens für die gewünschte Auswertungsart (z.B. Verlauf- oder punktuelle Kontrolle) von Herrn Dr. Michael Kohlhaas erstellte Excel-Datei übertragen. Das Programm berechnet die Fluoreszenz-Intensität und bildet eine Ratio. Dieser Datensatz wird ebenfalls in eine Excel-Tabelle übertragen. Sobald dieser Prozess mit allen Zellen eines Protokolls durchgeführt wurde, kann auch hier mit GraphPad Prism eine Statistik erstellt werden.

## 3. Statistik

Die Statistik wird mit dem Programm GraphPad Prism 6.01 erstellt. Neben der Möglichkeit einfache deskriptive Statistiken zu berechnen, können auch Tests durchgeführt werden, um signifikante Unterschiede zwischen Messergebnissen darzustellen. Ein Ergebnis ist signifikant, wenn die Wahrscheinlichkeit  $p$  eines  $\alpha$ -Fehlers  $<0.05$  ist. Man bezeichnet den  $\alpha$ -Fehler auch als Irrtumswahrscheinlichkeit. Durch Festlegung verschiedener Signifikanzniveaus (z.B.:  $p <0.05$ ;  $p <0.01$ ;  $p <0.001$ ) ist es möglich signifikante Ergebnisse besser voneinander zu unterscheiden und zu interpretieren.

Folgende Tests werden verwendet:

1. One-Way ANOVA/ Two-Way ANOVA (#) zur Varianzanalyse (ANOVA: Analysis of variance)
2. Bonferroni-Posttest zur Überprüfung der ANOVA (\*)
3. Gepaarte/ Ungepaarte T-Tests (\$)

Alle Tests wurden mit  $*=p\leq 0.05$  /  $**=p\leq 0.01$  /  $***=p\leq 0.001$  /  $****=p\leq 0.0001$  als Signifikanzniveaus durchgeführt. In den entsprechenden Abbildungen wurde die Beschriftung (n.s.) für „nicht signifikant“ gewählt. Zur Veranschaulichung der Ergebnisse wurde eine grafische Darstellung angefertigt.

## 4 Ergebnisse

Das Hauptziel der Arbeit bestand darin, die Effekte von Levosimendan (Levo) und Omecamtiv Mecarbil (OM) auf systolische und diastolische Funktion von Herzmuskelzellen aus dem Meerschweinchen zu untersuchen, hierbei den zugrundeliegenden Mechanismus für die Steigerung der Kontraktilität näher zu ergründen und darüber hinaus die bioenergetischen Konsequenzen im Hinblick auf den mitochondrialen Redoxstatus und das Membranpotenzial zu analysieren.

### 4.1 Levosimendan: Experimente an isolierten Kardiomyozyten aus unbehandelten WT Meerschweinchen

Es wurden isolierte, adulte Herzmuskelzellen aus dem Meerschweinchen verwendet, weil in diesen die Mechanismen der elektromechanischen Kopplung dem Menschen ähnlicher sind als in der Maus oder Ratte.

Wir exponierten die elektrisch stimulierten Herzmuskelzellen zunächst mit aufsteigenden Levo-Konzentrationen im Vergleich zu einer Vehikel-Kontrolle, um die zeitlichen Veränderungen der physiologischen Parameter zu kontrollieren. Es zeigte sich hierbei nach der Anwendung von Levo eine moderate konzentrationsabhängige Abnahme der systolischen Sarkomerlänge sowie der Amplitude der (fraktionellen) systolischen Sarkomerverkürzung, während dies in der Vehikel-Kontrolle nicht der Fall war (Abbildung 24A). Gegenüber der Vehikel-Kontrolle kam es hierbei zu einer signifikanten Abnahme der systolischen Sarkomerlänge bei 10  $\mu$ M Levo (Abbildung 24A). Die fraktionelle Sarkomerverkürzung unterschied sich nicht signifikant von der Vehikel-Kontrolle, was auf eine stärkere Sarkomerverkürzung zum Ausgangszeitpunkt in der Vehikel-Kontrolle zurückzuführen war (Abbildung 24B). Die diastolische Sarkomerlänge unterschied sich in beiden Gruppen nicht voneinander (Abbildung 24A). Die Analyse der Kinetik von Zellverkürzung und -verlängerung ergab eine moderate Beschleunigung der Zeit zur 50%igen bzw. 90%igen Wiederverlängerung bei 10  $\mu$ M Levo im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle ( $RT_{50}$  und  $RT_{90}$ ; Abbildung 24C), während sich die Zeit bis zur maximalen Zellverkürzung (sog. Time-to-peak, TTP) nicht zwischen den Gruppen unterschied (Abbildung 24D).

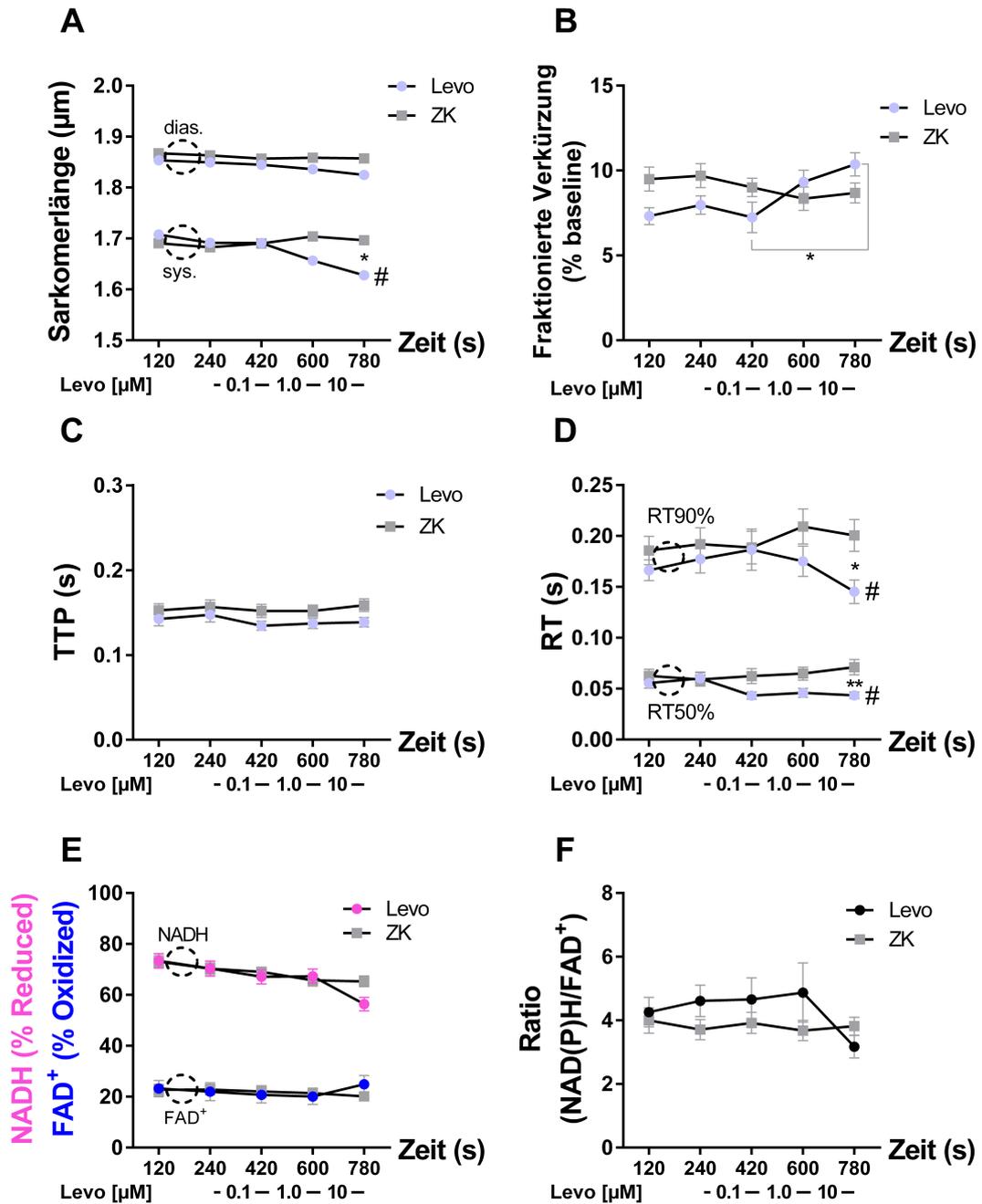


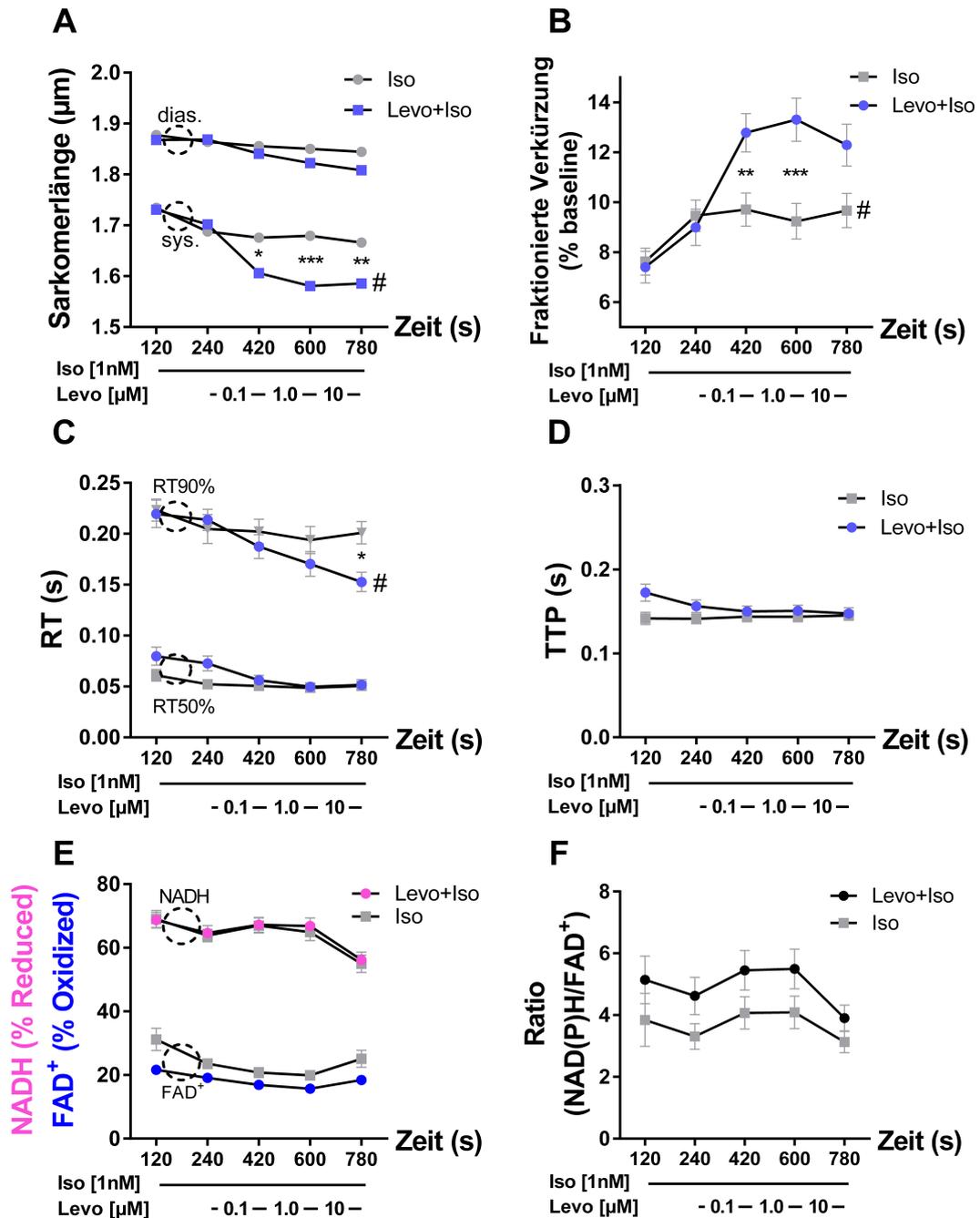
Abbildung 24: Protokoll 1: Parameter der Zellverkürzung von Levo (n=29) und Zeitkontrolle (ZK) (n=28), sowie Redoxstatus von NAD(P)H/ NAD(P)<sup>+</sup>, FADH<sub>2</sub>/ FAD und deren Verhältnis (Ratio) mit Levo (n=22) und ZK (n=26), über die Zeit (s);

**A:** Systolische (sys.) und diastolische (dias.) Sarkomerlänge von Levo im Vergleich zur Zeitkontrolle (ZK). **B:** Fraktionierte Zellverkürzung (FS). **C:** Relaxationszeit (RT) (50%/ 90% zur Baseline) von Levo im Vergleich zur ZK. **D:** Zeit zum Verkürzungsmaximum (TTP) von Levo im Vergleich zur ZK. **E:** Redoxstatus von NAD(P)H und FADH<sub>2</sub> für Levo im Vergleich zur ZK-Gruppe. **F:** Verhältnis von NAD(P)H zu FADH<sub>2</sub> als ratiometrischer Indikator des mitochondrialen Redoxstatus. Signifikant stärkere sys. Zellverkürzung bei höchster Levo-Konzentration im Vergleich zur ZK. Die Parameter RT und TTP zeigen keine signifikanten Differenzen. Leichte Oxidation der Redoxäquivalenten in höheren Konzentrationen ohne signifikante

Abweichungen von der ZK-Gruppe. *One-way ANOVA mit Bonferroni-Test und Two-way ANOVA mit Bonferroni-Test (#) zur Signifikanztestung (\*= $p < 0.05$ / \*\*= $p < 0.01$ / \*\*\*= $p < 0.001$ / \*\*\*\*= $p < 0.001$ ).*

Um die bioenergetische Konsequenz des inotropen Effektes von Levo zu untersuchen, wurde der mitochondriale Redoxstatus von NAD(P)H und FAD bestimmt. Klassische  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitizer verursachen eine Oxidation von NAD(P)H und FAD, da durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensibilisierung der Myofilamente mehr ATP bei gleicher zytosolischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration verbraucht wird. Das resultierende ADP oxidiert, durch Beschleunigung des Elektronenflusses an der Atmungskette, NADH zu  $\text{NAD}^+$  und  $\text{FADH}_2$  zu FAD, da keine balancierende Zunahme der mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme den Citratzyklus aktiviert, um diese Oxidation wieder auszugleichen. Durch die Applikation von Levo kam es bei 10  $\mu\text{M}$  zu einer leichten Oxidation von NAD(P)H gegenüber dem Ausgangswert, was in der Vehikel-Kontrolle nicht der Fall war (Abbildung 24E). Auch nach Bildung des Quotienten von NAD(P)H/FAD zeigte sich eine Oxidation bei 10  $\mu\text{M}$  Levo, die allerdings im direkten Vergleich zur Vehikel-Kontrolle nicht signifikant unterschiedlich war (Abbildung 24F).

Das Ausmaß der Steigerung der Zellverkürzung stellte sich moderat dar. Dieser Vorgang war erst bei hoher Levo-Konzentration zu beobachten. Levo ist neben einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensibilisierung der Myofilamente auch ein potenter Hemmer der PDE3. Daher führten wir Experimente nach Vorstimulation mit einer geringen Konzentration des  $\beta$ -adrenergen Rezeptor ( $\beta$ -AR) Agonisten Isoprenalin (Iso, 1 nM) durch. Die Zugabe von Iso allein führte zu einer leichten Abnahme der systolischen Sarkomerlänge bzw. Zunahme der fraktionellen Sarkomerverkürzung, die bereits durch die Zugabe von 0.1  $\mu\text{M}$  Levo deutlich erhöht wurde (Abbildung 25A und B). 1 nM Iso allein vermochte hierbei nicht die  $\text{RT}_{50}$  oder  $\text{RT}_{90}$  zu beschleunigen, doch durch die zusätzliche Verwendung von Levo kam es zu einer konzentrationsabhängigen Verkürzung der  $\text{RT}_{90}$ , aber nicht  $\text{RT}_{50}$  (Abbildung 25C). Die TTP blieb durch beide Behandlungen unverändert (Abbildung 25D).



**Abbildung 25: Protokoll 2: Parameter der Zellverkürzung von Levo+Iso (n=35) und Iso (n=35), sowie Redoxstatus von NAD(P)H/ NAD(P)<sup>+</sup>, FADH<sub>2</sub>/ FAD<sup>+</sup> und deren Verhältnis (Ratio) mit Levo+Iso (n=29) und Iso (n=27), über die Zeit (s);**

**A:** Systolische (Sys.) und diastolische (dias.) Sarkomerlänge von Levo+Iso im Vergleich zur Iso-Gruppe. **B:** Fraktionierte Zellverkürzung (FS) von Levo+Iso im Vergleich zur Iso-Gruppe. **C:** Relaxationszeit (RT) (50%/ 90% zur Baseline) von Levo+Iso im Vergleich zur Iso-Gruppe. **D:** Zeit zum Verkürzungsmaximum (TTP) von Levo+Iso im Vergleich zur Iso-Gruppe. **E:** Redoxstatus von NAD(P)H und FADH<sub>2</sub> für Levo+Iso im Vergleich zur Iso-Gruppe. **F:** Verhältnis von NAD(P)H zu FADH<sub>2</sub> als ratiometrischer Indikator des mitochondrialen Redoxstatus. Signifikant stärkere sys. Zellverkürzung unter Levo+Iso im Vergleich zur

Behandlung mit Iso allein. Verkürzte RT<sub>90</sub> von Levo+Iso im Vergleich zur Behandlung mit Iso allein in höchster Levo Konzentration. Keine signifikante Beeinflussung der Redoxäquivalenten von Levo+Iso im Vergleich zur Iso-Gruppe. *One-way ANOVA mit Bonferroni-Test und Two-way ANOVA mit Bonferroni-Test (#) zur Signifikanztestung (\*=p<0.05/ \*\*=p<0.01/ \*\*\*=p<0.001/ \*\*\*\*=p<0.001).*

Auch nach dieser geringen  $\beta$ -AR Vorstimulation blieb der mitochondriale Redoxstatus von NAD(P)H und FAD bis 1  $\mu$ M Levo unverändert, bewirkte allerdings bei 10  $\mu$ M eine signifikante Oxidation von NAD(P)H, aber nicht FAD (Abbildung 25E). Im Vergleich zur Vehikel-Behandlung ergab sich kein Unterschied zwischen den Gruppen, auch nicht nach Analyse des NAD(P)H/FAD Verhältnis (Abbildung 25E und F).

In der Gegenüberstellung der Gruppen Levo *allein* versus Levo+Iso zeigt sich nun deutlich, dass die geringe Steigerung der Sarkomerverkürzung durch Levo allein in der Gegenwart von 1 nM Iso deutlich potenziert und in seiner Effizienz gesteigert wird (Abbildung 26A und B). Die Beschleunigung der RT<sub>90</sub> und RT<sub>50</sub> durch Levo+Iso gegenüber Levo allein war jedoch nicht signifikant unterschiedlich (Abbildung 26C) und hinsichtlich der TTP ergaben sich keinerlei Unterschiede im Zeitverlauf oder zwischen den Gruppen (Abbildung 26D). Auch hinsichtlich des Redoxstatus von NAD(P)H und FAD gab es keine Unterschiede zwischen den Gruppen (Abbildung 26E und F).

Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass in Meerschweinchen Kardiomyozyten Levo allein nur eine moderate Steigerung der Sarkomerverkürzung hervorruft, doch in der Gegenwart einer geringen  $\beta$ -AR Vorstimulation eine Potenzierung und Steigerung der Effektivität dieses Phänomens auftritt. Die Verbesserung der diastolischen Kinetik, insbesondere in der Gegenwart einer geringen  $\beta$ -AR Vorstimulation, spricht gegen den Effekt einer reinen Ca<sup>2+</sup>-Sensibilisierung der Myofilamente und ähnelt den Effekten einer PDE3-Inhibition. Aus diesem Grunde gingen wir im nächsten Protokoll der Frage nach, ob die Potenzierung der Levo-induzierten Sarkomerverkürzung in der Gegenwart einer  $\beta$ -AR Vorstimulation durch eine Steigerung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationsamplitude ( $\Delta[Ca^{2+}]_c$ ) herbeigeführt wird. Aus bioenergetischer Sicht wäre dies günstig, da eine Steigerung der  $\Delta[Ca^{2+}]_c$  auch eine vermehrte mitochondriale Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme und somit Stimulation des Citratzyklus bewirken könnte, um hierdurch den mitochondrialen Redoxstatus von NAD(P)H und FAD weitgehend konstant zu halten, trotz Steigerung der Arbeitslast (und somit ADP-induzierter Oxidation von NADH und FAD).

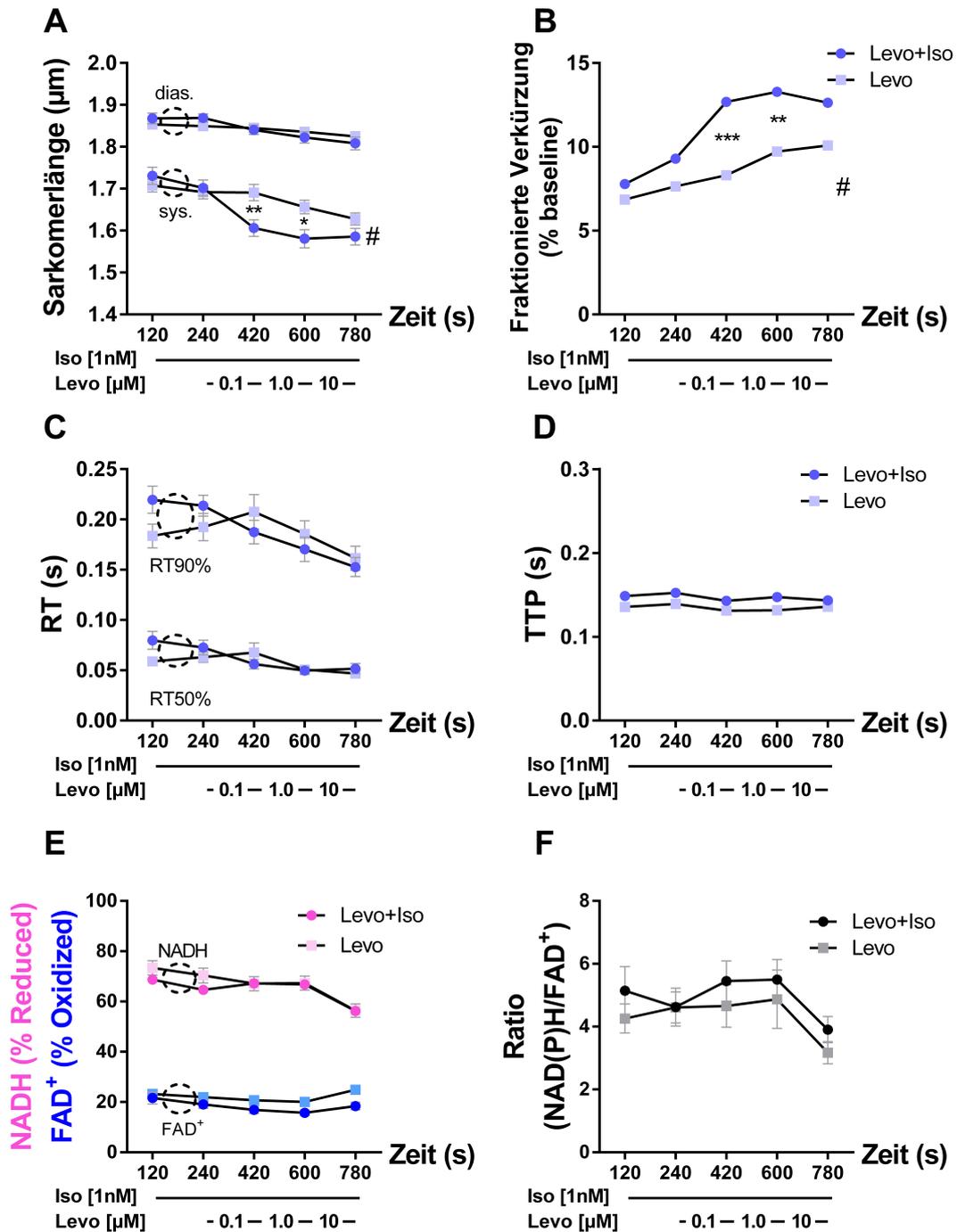
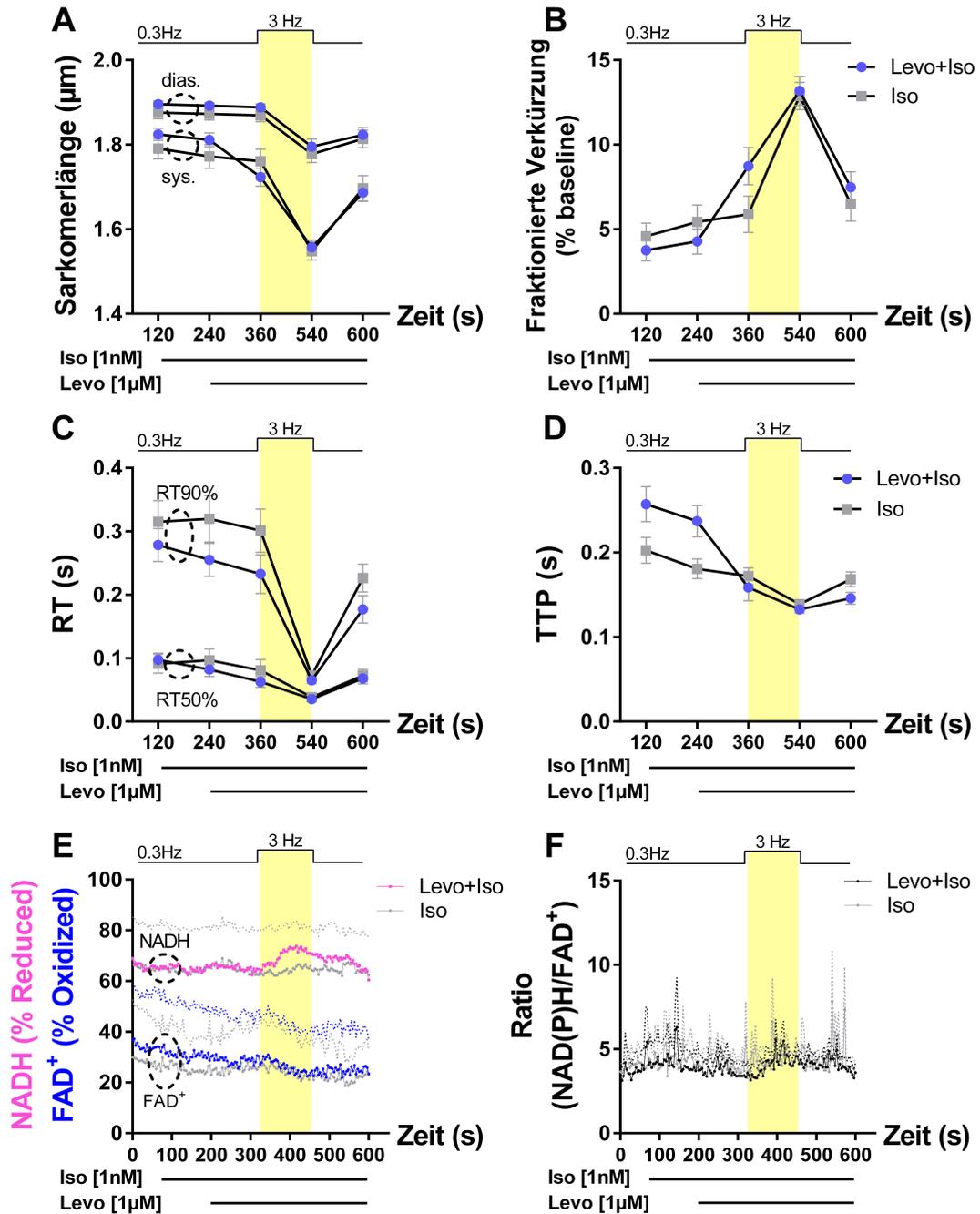


Abbildung 26: Vergleich Levo-Gruppen aus Protokoll 1 und 2: Parameter der Zellverkürzung von Levo+Iso (n=35) und Levo (n=29), sowie Redoxstatus von NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup>, FADH<sub>2</sub>/FAD<sup>+</sup> und deren Verhältnis (Ratio) von Levo+Iso (n=35) und Levo (n=29) über die Zeit (s);

**A:** Systolische und diastolische Sarkomerlänge von Levo+Iso im Vergleich zu Levo. **B:** Fraktionierte Zellverkürzung (FS). **C:** Relaxationszeit (RT) (50%/ 90% zur Baseline). **D:** Zeit zum Verkürzungsmaximum (TTP). **E:** Redoxstatus von NAD(P)H und FADH<sub>2</sub> für Levo+Iso im Vergleich zu Levo. **F:** Verhältnis von NAD(P)H zu FADH<sub>2</sub> als ratiometrischer Indikator des mitochondrialen Redoxstatus. Die Zellverkürzung wird im sys. Bereich mit Iso signifikant erhöht. Die Diastolendauer bleibt weitgehend unbeeinflusst. Keine

signifikanten Unterschiede im Redoxstatus mit Levo+Iso. *Two-way ANOVA mit Bonferroni-Test (#) zur Signifikanztestung (\*= $p < 0.05$ / \*\*= $p < 0.01$ / \*\*\*= $p < 0.001$ / \*\*\*\*= $p < 0.001$ ).*

Zu diesem Zwecke wurden Kardiomyozyten zunächst einem Protokoll ausgesetzt, bei dem ein abrupterer Wechsel der Arbeitslast durch eine Steigerung der Stimulationsfrequenz von 0.3 auf 3 Hz durchgeführt wurde. Alle Experimente wurden in der Gegenwart einer unterschwelligen Iso-Konzentration von 1 nM durchgeführt, in der Abwesenheit und Gegenwart von 1  $\mu$ M Levo, einer Konzentration, die allein keine Zunahme der Zellverkürzung verursacht hatte (Abbildung 24). Die kombinierte Applikation von Levo+Iso führte, ähnlich wie in dem 1 Hz Protokoll (Abbildung 25), zu einer Zunahme der fraktionellen Sarkomerverkürzung bei 0.3 Hz (Abbildung 27A und B). Nach Steigerung der Stimulationsfrequenz auf 3 Hz kam es auch in der Gruppe mit Iso allein zu einer deutlichen Steigerung der Sarkomerverkürzung. Es bestanden keine Unterschiede mehr zwischen beiden Gruppen hinsichtlich der systolischen Sarkomerlänge oder der fraktionellen Sarkomerverkürzung (Abbildung 27A und B). Diese Zunahme war mit einer deutlichen Steigerung der  $RT_{90}$  und  $RT_{50}$  in beiden Gruppen assoziiert, und auch einer Verkürzung der TTP, auch hier ohne Unterschiede zwischen beiden Gruppen (Abbildung 27C und D). Der Redoxstatus von NAD(P)H und FAD blieb über das Experiment weitgehend ohne wesentliche Oxidation konstant (Abbildung 27E und F).

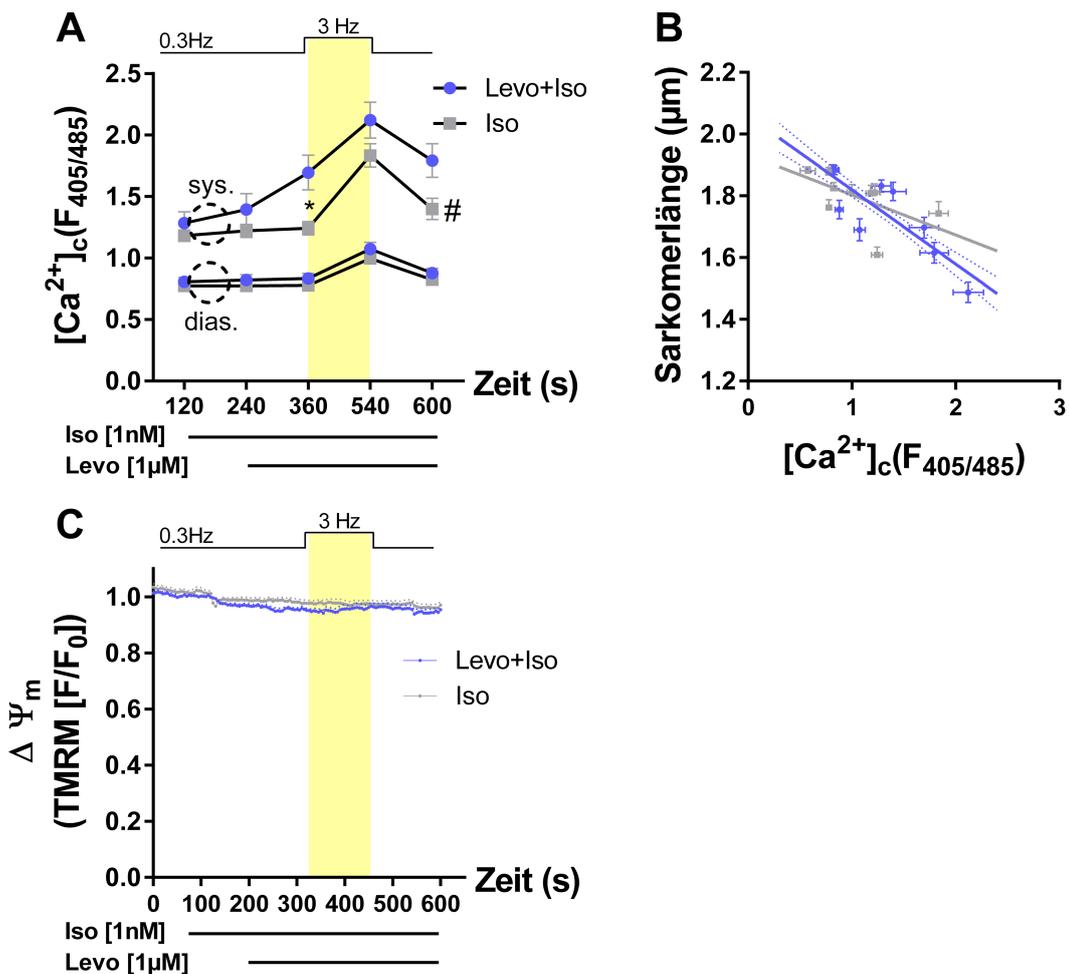


**Abbildung 27: Protokoll 3: Stressprotokoll. Parameter der Zellverkürzung von Levo+Iso (n=18) und Iso (n=19), sowie Redoxstatus von NAD(P)H/ NAD(P)<sup>+</sup>, FADH<sub>2</sub>/ FAD<sup>+</sup> und deren Verhältnis (Ratio) mit Levo+Iso (n=18) und Iso (n=19) als Verlauf über die Zeit (s). Stimulationsfrequenz bei 0.3 Hz, bzw. 3 Hz (gelb unterlegter Bereich).**

**A:** Systolische und diastolische Sarkomerlänge von Levo+Iso im Vergleich zu Iso. **B:** Fraktionierte Zellverkürzung (FS) von Levo+Iso im Vergleich zu Iso. **C:** Relaxationszeit (RT) (50 %/ 90 % zur Baseline) von Levo+Iso im Vergleich zu Iso. **D:** Zeit zum Verkürzungsmaximum (TTP) von Levo+Iso im Vergleich zu Iso. **E:** Redoxstatus von NAD(P)H und FADH<sub>2</sub> für Levo+Iso im Vergleich zur Iso-Gruppe. **F:** Verhältnis von NAD(P)H zu FADH<sub>2</sub> als ratiometrischer Indikator des mitochondrialen Redoxstatus von Levo+Iso im

Vergleich zur Iso-Gruppe. Physiologische Veränderung der Zellverkürzungsparameter bei Erhöhung der Stimulationsfrequenz. Keine signifikanten Unterschiede zwischen der Levo+Iso und der Iso-Gruppe. Ausgeglichener Redoxhaushalt auch bei erhöhter Stimulationsfrequenz allenfalls leichte Oxidation im physiologischen Bereich. *Two-way ANOVA mit Bonferroni-Test (#) zur Signifikanztestung (\*= $p < 0.05$ / \*\*= $p < 0.01$ / \*\*\*= $p < 0.001$ / \*\*\*\*= $p < 0.001$ ).*

Um zu analysieren, ob die Zunahme der Sarkomerverkürzung durch die Kombination aus Levo+Iso durch eine Zunahme der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu erklären ist (was für eine relevante PDE3-Stimulation und gegen eine reine  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensibilisierung der Myofilamente durch Levo sprechen könnte), wurden Kardiomyozyten mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Farbstoff Indo-1 AM inkubiert. Die Fluoreszenz wurde zusammen mit der Sarkomerlänge der jeweils selben Zelle bestimmt. Gleichzeitig wurden Kardiomyozyten mit TMRM inkubiert, einem potentiometrischen Farbstoff zur Bestimmung des mitochondrialen Membranpotenzials ( $\Delta\Psi_m$ ). Es wurde hierunter das gleiche Protokoll wie in Abbildung 27 durchgeführt.



**Abbildung 28: Protokoll 4: Stressprotokoll. Intrazelluläre Calciumkonzentration  $[Ca^{2+}]_c$  und mitochondriales Membranpotential ( $\Delta\Psi_m$ ) von Levo+Iso (n=14) und Iso (n=11) über die Zeit (s) (A/C), bzw. gegen die Sarkomerlänge ( $\mu m$ ) (B). Stimulationsfrequenz bei 0.3 Hz, bzw. 3 Hz (gelb unterlegter Bereich).**

**A:**  $[Ca^{2+}]_c$  von Levo+Iso im Vergleich zu Iso. **B:**  $[Ca^{2+}]_c$  von Levo+Iso im Vergleich zu Iso gegen die systolische (sys.) und diastolische (dias.) Sarkomerlänge ( $\mu m$ ). Darstellung der  $[Ca^{2+}]_c$ -Werte in Form von MW + SEM. **C:** TMRM (Tetramethylrhodaminmethylester) als ratiometrischer Indikator des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ) von Levo+Iso im Vergleich zu Iso. Der sys.  $Ca^{2+}$ -Transient ist mit Levo+Iso signifikant erhöht, was sich auch im Vergleich zur Sarkomerlänge darstellt. Bei gleicher  $[Ca^{2+}]_c$  ist die Sarkomerlänge innerhalb der Levo+Iso-Gruppe stärker verkürzt. Das mitochondriale Membranpotential ( $\Delta\Psi_m$ ) bleibt durchgehend konstant. *Two-way ANOVA mit Bonferroni-Test (#) zur Signifikanztestung (\*= $p < 0.05$ / \*\*= $p < 0.01$ / \*\*\*= $p < 0.001$ / \*\*\*\*= $p < 0.001$ ).*

1 nM Iso allein führte zu keiner Steigerung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration  $[Ca^{2+}]_c$  bei 0.3 Hz. Allerdings wurde durch Levo+Iso bei 0.3 Hz die systolische  $[Ca^{2+}]_c$  gegenüber Iso allein signifikant gesteigert (Abbildung 28A). Bei Auftragung der  $[Ca^{2+}]_c$  gegen die entsprechende Sarkomerverkürzung findet sich zwar auch eine Veränderung der Steigung der Korrelationsgeraden (Abbildung 28B), die eine Levo-induzierte Erhöhung der  $Ca^{2+}$ -Affinität der Myofilamente anzeigen könnte, allerdings war dieser Effekt nicht signifikant. Das mitochondriale Membranpotenzial blieb während des gesamten Versuchsablaufes konstant in beiden Gruppen (Abbildung 28C).

Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass die als  $Ca^{2+}$ -Sensitizer vermarktete Substanz Levosimendan allein nur einen geringen  $Ca^{2+}$ -sensibilisierenden, positiv inotropen Effekt auf die Sarkomerverkürzung in isolierten Meerschweinchen Herzmuskelzellen hat. Durch eine unterschwellige Stimulation  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren kommt es zu einer deutlichen Potenzierung und gesteigerten Effektivität der Sarkomerverkürzung durch Levosimendan. Die Steigerung der Sarkomerverkürzung wird hierbei durch eine Steigerung der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Transienten herbeigeführt, was für eine relevante PDE3-Aktivierung spricht, wobei die  $Ca^{2+}$ -Sensibilisierung der Myofilamente durch Levosimendan eine untergeordnete Rolle für die Kontraktilitätssteigerung spielt. Bioenergetisch resultiert dies in einem neutralen Effekt auf den Redoxstatus von NAD(P)H und FAD, da von einer Steigerung der mitochondrialen  $Ca^{2+}$ -Aufnahme auszugehen ist, die eine relevante Oxidation durch die Steigerung der Arbeitslast verhindert.

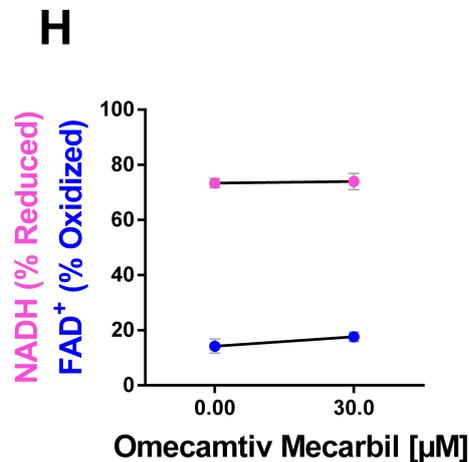
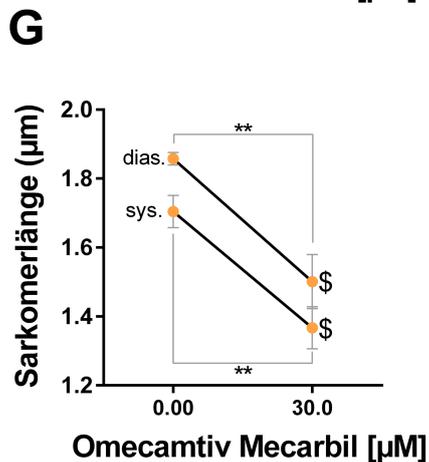
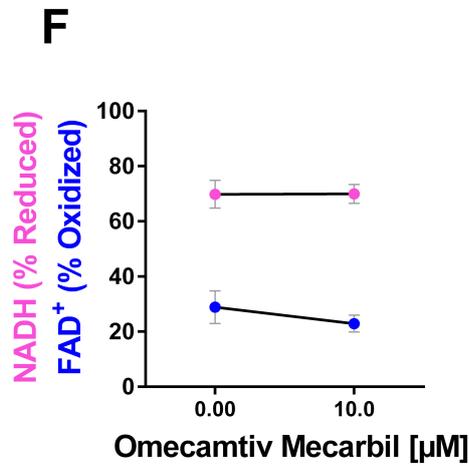
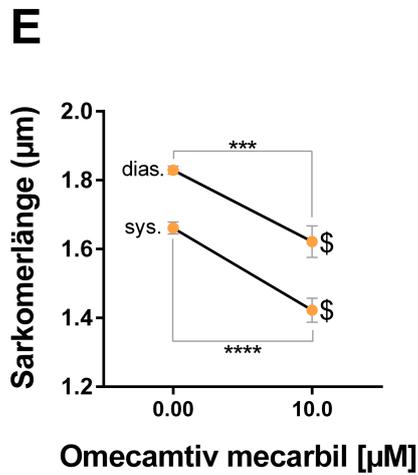
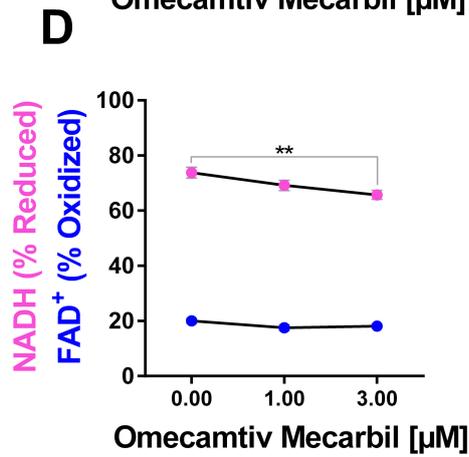
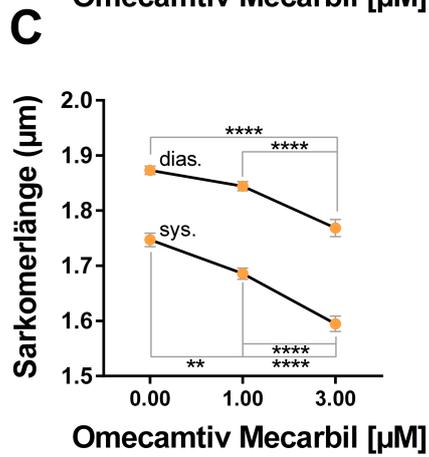
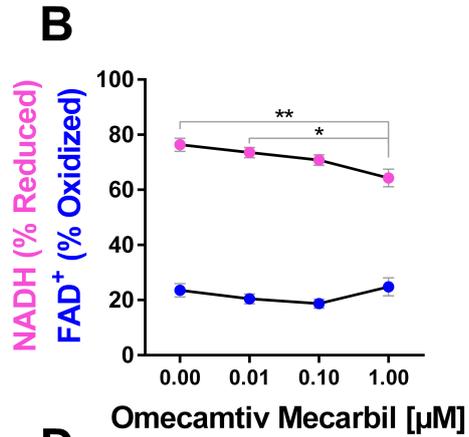
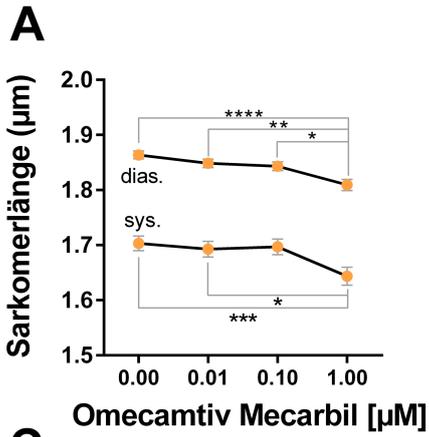
## 4.2 Omecamtiv Mecarbil: Experimente an isolierten Kardiomyozyten aus unbehandelten WT Meerschweinchen

Omecamtiv Mecarbil (OM) wurde als selektiver Aktivator der Myosin ATPase entwickelt, ohne (im Gegensatz zu Levo) die zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentrationen zu beeinflussen (MALIK et al., 2011). In früheren Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass durch OM die Amplitude und Dauer der Kontraktion von Herzmuskelzellen vergrößert wird (MALIK et al., 2011). Unklar ist, ob es durch diese Intervention zu einer Steigerung des Energiebedarfs der Zelle kommt (MAACK et al., 2019). Ein gesteigerter ATP-Bedarf würde durch Erhöhung von ADP zu einer Beschleunigung des Elektronenflusses an der Atmungskette führen. Dies würde bei fehlender Regeneration reduzierender Äquivalente, durch eine Steigerung der zytosolischen und mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen mit Citratzyklus-Stimulation, eine Oxidation von NADH und  $\text{FADH}_2$  hervorrufen.

Es wurden daher Experimente mit unterschiedlichen Konzentrationen von OM durchgeführt und hierbei neben der Sarkomerlänge und -verkürzung auch der Redoxstatus von NAD(P)H und FAD bestimmt. Die Stimulationsfrequenz lag hierbei durchgängig bei 1 Hz. Die ideale Plasmakonzentration von OM bei der Behandlung der systolischen Herzinsuffizienz liegt bei etwa  $1 \mu\text{mol/L}$  (MAACK et al., 2019), wobei aufgrund einer Plasmaproteinbindung von  $\sim 80\%$  eine freie Konzentration von OM von  $200 \text{ nmol/L}$  zu erwarten ist (MORGAN et al., 2010).

Die folgenden Konzentrationen wurden hierbei in jeweils kurzen Protokollen verwendet, um einen relevanten „run-down“ der Sarkomerverkürzung, aber insbesondere auch der Autofluoreszenz von NAD(P)H und FAD zu vermeiden:

- Protokoll 1:  $0.01, 0.1$  und  $1 \mu\text{M}$  (Abbildung 29A, B)
- Protokoll 2:  $1$  und  $3 \mu\text{M}$  (Abbildung 29C, D)
- Protokoll 3:  $10 \mu\text{M}$  (Abbildung 29E, F)
- Protokoll 4:  $30 \mu\text{M}$  (Abbildung 29G, H)



**Abbildung 29: Protokoll 1-4: Systolische und diastolische Zellverkürzung; Redoxstatus von NAD(P)H/ NAD(P)<sup>+</sup>, FADH<sub>2</sub>/ FAD<sup>+</sup> von 0 bis 1  $\mu$ M OM (n=17), von 0 bis 3  $\mu$ M OM (n=38), von 0 bis 10  $\mu$ M OM (n=17) und von 0 bis 30  $\mu$ M OM (n=5).**

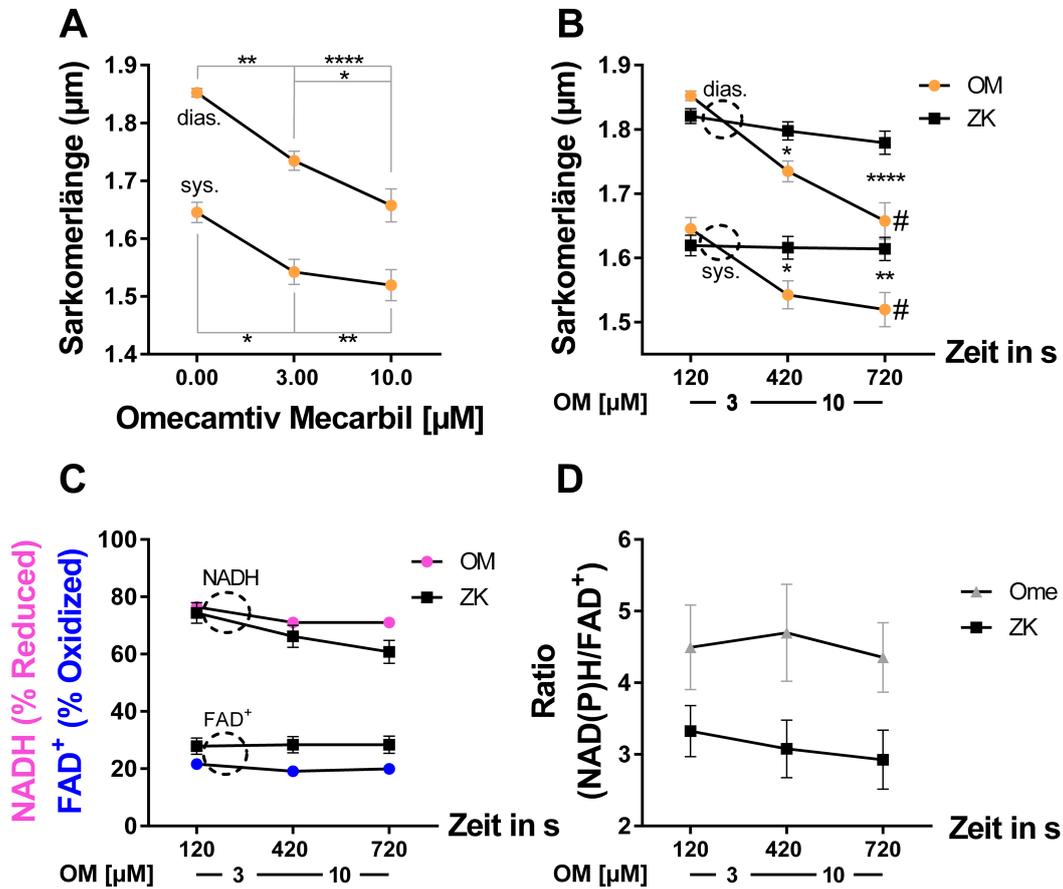
**A:** Systolische (sys.) und diastolische (dias.) Zellverkürzung von OM 0-1  $\mu$ M. **B:** Redoxstatus von NAD(P)H und FADH<sub>2</sub> von OM 0-1  $\mu$ M. **C:** Systolische (sys.) und diastolische (dias.) Zellverkürzung von OM 0-3  $\mu$ M. **D:** Redoxstatus von NAD(P)H und FADH<sub>2</sub> von OM 0-3  $\mu$ M. **E:** Systolische (sys.) und diastolische (dias.) Zellverkürzung von OM 0-10  $\mu$ M. **F:** Redoxstatus von NAD(P)H und FADH<sub>2</sub> von OM 0-10  $\mu$ M. **G:** Systolische (sys.) und diastolische (dias.) Zellverkürzung von OM 0-30  $\mu$ M. **H:** Redoxstatus von NAD(P)H und FADH<sub>2</sub> von OM 0-30  $\mu$ M. Die dias. Zelllänge wird mit steigender OM-Konzentration kürzer. Gleichzeitig stetig stärkere sys. Zellverkürzung. Der Redoxstatus verbleibt konstant. *Ungepaarter T-Test (\$)* zur statistischen Analyse (\*= $p < 0.05$ / \*\*= $p < 0.01$ / \*\*\*= $p < 0.001$ / \*\*\*\*= $p < 0.001$ ). *One-way ANOVA mit Bonferroni-Test zur Signifikanztestung* (\*= $p < 0.05$ / \*\*= $p < 0.01$ / \*\*\*= $p < 0.001$ / \*\*\*\*= $p < 0.001$ ).

In Abbildung 29 ist zu erkennen, dass OM in den verschiedenen Protokollen zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme der systolischen, aber auch diastolischen Sarkomerlänge führt. Während der Redoxstatus von NAD(P)H bei den längeren Protokollen mit 0.01-1  $\mu$ M (Abbildung 29A, B) oder 1-3  $\mu$ M (Abbildung 29C, D) leicht abnimmt, ist keine relevante Oxidation von FAD zu beobachten. Bei Einsatz sehr hoher Einzelkonzentrationen von OM (10 und 30  $\mu$ M) ist keine Veränderung des Redoxstatus von NAD(P)H und FAD zu beobachten, trotz ausgeprägter (supraphysiologischer) Zunahme der systolischen und diastolischen Sarkomerlänge (Abbildung 29E-H).

Im anschließenden Protokoll wird eine Zeitkontroll-Gruppe (ZK) zur besseren Objektivierung von zeitlichen Effekten hinzugefügt, besonders im Hinblick auf die Autofluoreszenzen. Eine Messung beläuft sich auf 720 s (Abbildung 30). Die systolische und diastolische Sarkomerverkürzung zeigt sich innerhalb der OM-Gruppe, wie in den Abschnitten zuvor, signifikant verkürzt (Abbildung 30A). Betrachtet man die ZK im Vergleich, zeigt sich ein konstanter Verlauf über die Zeit, was entsprechende signifikante Unterschiede zur OM-Gruppe ergibt (Abbildung 30B).

Auch in diesem Protokoll bleibt der Redoxstatus für beide Gruppen konstant und zeigt keinen Hinweis auf einen höheren Energieverbrauch durch OM, der in einer vermehrten Oxidation der Redoxäquivalente zu erkennen wäre (Abbildung 30C). Da sich NAD(P)H und FAD gegensätzlich in ihrer Fluoreszenz bei Oxidation verhalten (NAD(P)H Fluoreszenz nimmt ab, die von FAD zu), erlaubt die Bildung eines Quotienten von NADPH/FAD die Bestimmung des Redoxstatus unter Elimination von möglichen Bewegungsartefakten. Diese Elimination ist insbesondere bei der starken

Veränderung der systolischen und diastolischen Sarkomerlänge durch OM von Vorteil. Auch diese Ratio zeigt ebenfalls keine Reaktion auf die im Vergleich deutlichen, kontraktile Veränderungen (Abbildung 30D).

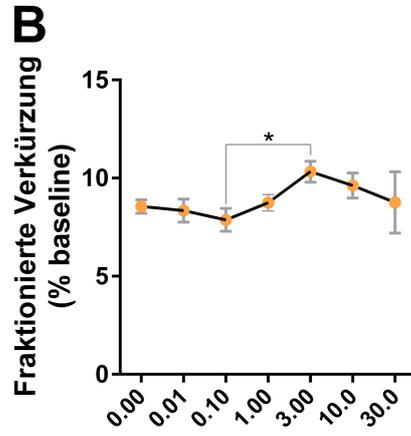
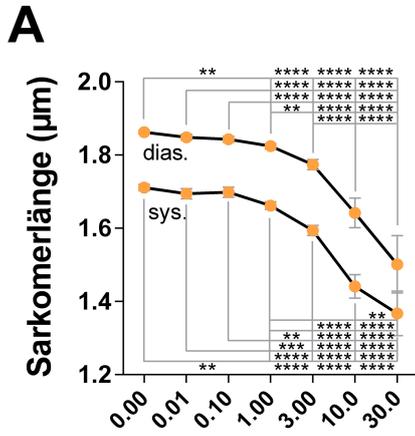


**Abbildung 30:** Systolische und diastolische Zellverkürzung von 0 bis 10 µM OM (n=28) im Vergleich zur Zeitkontrolle (ZK) (n=35), sowie der Redoxstatus von NAD(P)H/ NAD(P)<sup>+</sup>, FADH<sub>2</sub>/ FAD<sup>+</sup> von 0 bis 10 µM OM (n=28) im Vergleich zu Zeitkontrolle (ZK) (n=35).

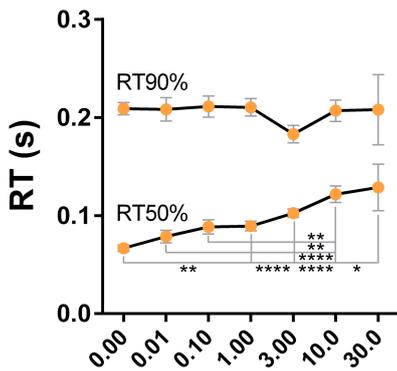
**A:** Systolische (sys.) und diastolische (dias.) Zellverkürzung der OM-Gruppe. **B:** Sys. und dias. Zellverkürzung der OM-Gruppe im Vergleich zur ZK-Gruppe. **C:** Redoxstatus von NAD(P)H und FADH<sub>2</sub> der OM-Gruppe im Vergleich zur ZK-Gruppe. **D:** Verhältnis von NAD(P)H zu FADH<sub>2</sub> als ratiometrischer Indikator des mitochondrialen Redoxstatus. Die sys. und dias. Zellverkürzung mit OM ist im Vergleich zu ZK signifikant verstärkt. Der Redoxhaushalt verbleibt ausgeglichen. *One-way ANOVA mit Bonferroni-Test und Two-way ANOVA mit Bonferroni-Test (#) zur Signifikanztestung (\*=p<0.05/ \*\*=p<0.01/ \*\*\*=p<0.001/ \*\*\*\*=p<0.001).*

In der folgenden Abbildung ist die Zusammenführung der bisherigen Messergebnisse veranschaulicht (Abbildung 31). Es handelt sich um einen Zusammenschnitt verschiedener Messungen und nicht um *ein* kontinuierliches Protokoll, weshalb die

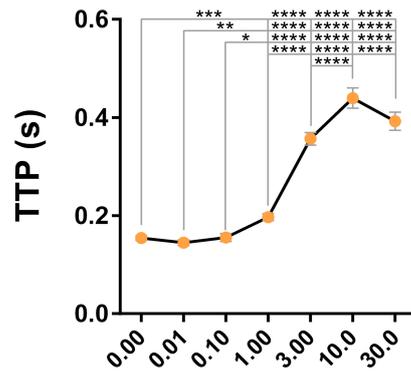
Ergebnisse nicht über die Zeit (s), sondern über die verschiedenen OM-Konzentrationen aufgetragen sind. Die Werte jeder angegebenen Konzentration wurden stets nach 300 s Wirkstoffbelastung erhoben.



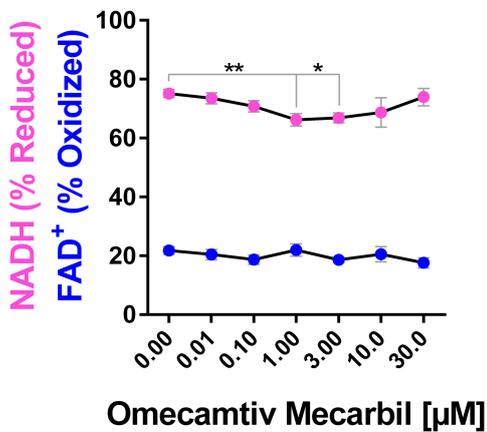
**C** Omecamtiv Mecarbil [µM]



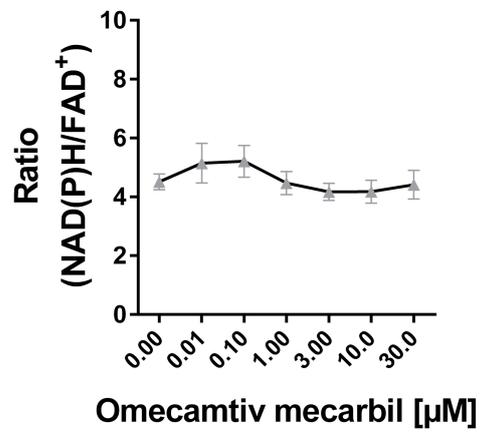
**D** Omecamtiv mecarbil [µM]



**E** Omecamtiv Mecarbil [µM]



**F** Omecamtiv Mecarbil [µM]

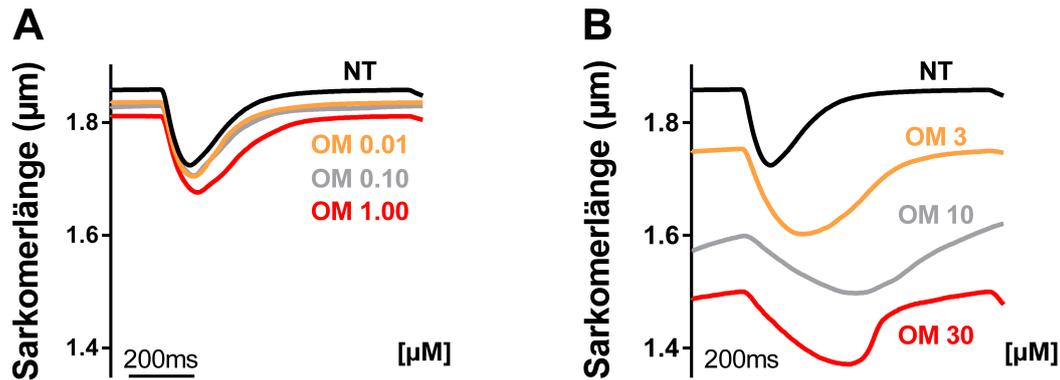


**Abbildung 31: Zusammenfassung Protokolle 1-5; Parameter der Zellverkürzung von 0-30  $\mu\text{M}$  OM; mit 0  $\mu\text{M}$  (n=119); 0.01/ 0.1  $\mu\text{M}$  (n=54); 1  $\mu\text{M}$  (n=92); 3  $\mu\text{M}$  (n=41); 10  $\mu\text{M}$  (n=20); sowie 30  $\mu\text{M}$  (n=5).**

**A:** Systolische (sys.) und diastolische (dias.) Zellverkürzung von OM 0-30  $\mu\text{M}$ . **B:** Fraktionierte Zellverkürzung (FS) von OM 0-30  $\mu\text{M}$ . **C:** Relaxationszeit (RT) (50 %/ 90 % zur Baseline) von OM 0-30  $\mu\text{M}$ . **D:** Zeit zum Verkürzungsmaximum (TTP) von OM 0-30  $\mu\text{M}$ . **E:** Redoxstatus von NAD(P)H und FADH<sub>2</sub> von OM 0-30  $\mu\text{M}$ . **F:** Verhältnis von NAD(P)H zu FADH<sub>2</sub> als ratiometrischer Indikator des mitochondrialen Redoxstatus von OM 0-30  $\mu\text{M}$ . Die sys. und dias. Zellverkürzung nimmt mit steigender Konzentration stetig zu. Das FS zeigt einen signifikanten Anstieg zwischen 0.1  $\mu\text{M}$  und 3  $\mu\text{M}$  OM. Die RT<sub>50</sub> steigt stetig signifikant an, während sich die TTP ab 1  $\mu\text{M}$  signifikant zum Ausgangswert verlängert. Keine vermehrte Oxidation von Redoxäquivalenten. *One-way ANOVA mit Bonferroni-Test und ungepaarter T-Test (\$)* zur Signifikanztestung (\*= $p < 0.05$ / \*\*= $p < 0.01$ / \*\*\*= $p < 0.001$ / \*\*\*\*= $p < 0.001$ ).

Die ausgeprägte Abnahme der systolischen und diastolischen Sarkomerlänge über die verschiedenen OM-Konzentrationen resultiert in einer optimalen Zunahme der fraktionellen Sarkomerverkürzung (FS) zwischen 0.1 und 3  $\mu\text{M}$ . Es wird kein Wirkungsplateau erreicht (Abbildung 31A und B). Die RT<sub>90</sub> zeigt sich weitgehend konstant, die RT<sub>50</sub> verlängert sich mit zunehmender Wirkstoffkonzentration ab 0.1  $\mu\text{M}$  OM signifikant (Abbildung 31C). Die TTP ist ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  OM signifikant zum Ausgangswert verlängert. Dies gilt ebenso für alle höheren OM-Konzentrationen (Abbildung 31D). Die Autofluoreszenz von FADH<sub>2</sub> bleibt durchweg über alle OM-Konzentrationen konstant. NAD(P)H weist im Gegensatz zu FADH<sub>2</sub> für 1  $\mu\text{M}$  und 3  $\mu\text{M}$  OM eine geringe, aber signifikante Oxidation zum Startwert auf (Abbildung 31E). Bei Bildung des NAD(P)H/FAD-Verhältnisses ist keine signifikante Oxidation des mitochondrialen Redoxstatus mehr zu beobachten (Abbildung 31F).

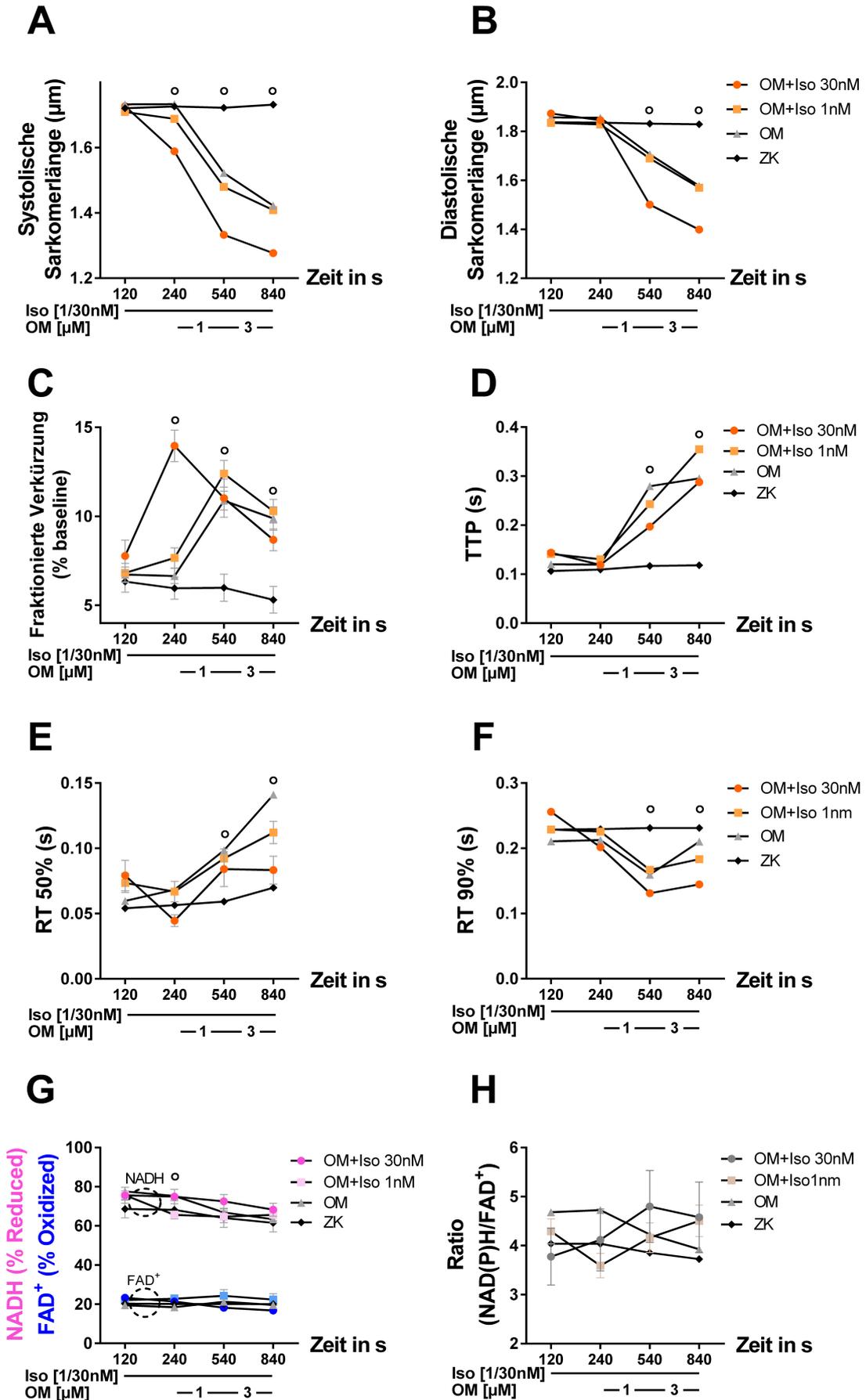
Zusammenfassend ist selbst bei starken kontraktiven Veränderungen *in vitro* keine Oxidation des Redoxstatus von NAD(P)H und FAD und somit auf indirektem Wege keine Steigerung des Energieverbrauchs durch OM zu messen. Laut Fachliteratur ist eine negative Eigenschaft von OM vor allem die Entstehung einer diastolischen Dysfunktion (MAACK et al., 2019). Um dies ebenfalls zu veranschaulichen, sind in Abbildung 32 die kumulativen Werte der Sarkomerverkürzungen unter den unterschiedlichen OM-Konzentrationen dargestellt. Diese veranschaulichen die deutliche Verlängerung der TTP, aber auch der diastolischen Sarkomerlänge mit zunehmenden OM-Konzentrationen.



**Abbildung 32: Zusammenfassung Protokolle 1-5: Kontraktionstransienten von kein (NT=Normale Tyrode) bis 30µM OM über 200 ms mit 0 µm (n=119); 0.01/ 0.1 µM (n=54); 1 µM (n=92); 3 µM (n=41); 10 µM (n=20); 30 µM (n=5);**

**A:** Mittelwerte aus der Kontraktionskinetik von 0.01/ 0.1/ 1 µM [OM] im Vergleich zur Gruppe mit Normaler Tyrode (NT). **B:** Mittelwerte aus der Kontraktionskinetik von 3/ 10/ 30 µM [OM] im Vergleich zur NT-Gruppe. Bis 1 µM [OM] kaum Veränderungen in der Morphologie der Transienten. Ab 3 µM ist die diast. Ausgangslänge der Zellen stark verändert; ebenso ist das Verkürzungsmaximum in der Systole in die Periode der eigentlichen Diastole verschoben. Ferner ist der Zeitpunkt der maximalen Relaxation immer verwaschener zu beurteilen und fällt für 30 µM bereits in die nächste Stimulationsphase.

Wir beleuchteten die kontraktile Veränderung durch OM bisher unter optimalen *in vitro* Bedingungen, um die Zellen möglichst wenig Stress auszusetzen. In diesem Fall scheint sich die Wirkung von OM nicht in einem erhöhten Sauerstoffverbrauch des myokontraktilem Apparates widerzuspiegeln. Im kardiogenen Schock schüttet der Körper allerdings hohe Mengen an Katecholaminen aus. Um die Reaktion der Kardiomyozyten auf vermehrten Stress zu testen, wird im folgenden Protokoll mit verschiedenen physiologischen Konzentrationen des  $\beta$ -adrenergen Agonisten Isoprenalin eine solche Situation imitiert (Abbildung 33). Ferner möchten wir überprüfen, ob die diastolische Dysfunktion bei höheren OM-Konzentrationen durch  $\beta$ -adrenerge Stimulation abgemildert wird, da durch Aktivierung der Adenylatzyklase ein positiv lusitroper Effekt ausgelöst wird (Abbildung 12).



**Abbildung 33: Protokoll 6: Parameter der Zellverkürzung, Redoxstatus von NAD(P)H/ NAD(P)<sup>+</sup>, FADH<sub>2</sub>/ FAD<sup>+</sup> und deren Verhältnis (Ratio) bei OM 1 µM/ 3 µM von: OM+Iso 30 nM (n=14); OM+Iso 1 nM (n=36); nur OM (n=50) und Zeitkontrolle (ZK) (n=12) über die Zeit (s);**

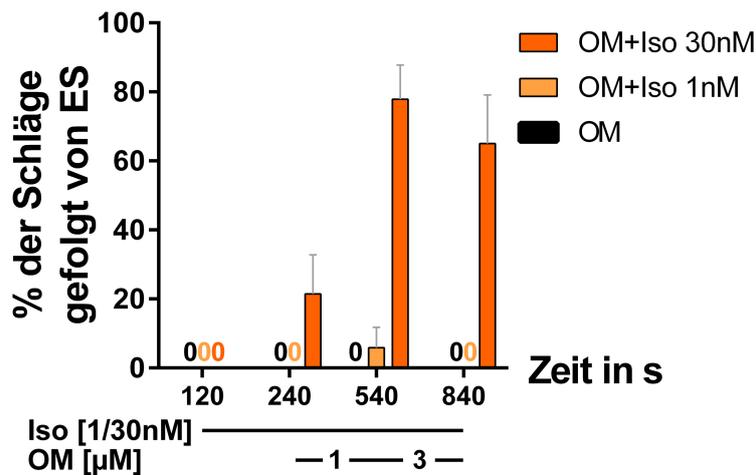
**A:** Systolische (sys.) Sarkomerlänge. 240s: Die OM+Iso 30nM-Gruppe ist zu allen anderen Gruppen signifikant. 540s: Die OM+Iso 30nM-Gruppe ist zu allen anderen Gruppen signifikant, die OM+Iso 1nM-Gruppe ist zur ZK-Gruppe signifikant. Die OM-Gruppe ist zur ZK-Gruppe signifikant. 840s: Die OM+Iso 30nM-Gruppe ist zu allen anderen Gruppen signifikant, die OM+Iso 1nM-Gruppe ist zur ZK-Gruppe signifikant, die OM-Gruppe ist zur ZK-Gruppe signifikant. **B:** Diastolische (dias.) Sarkomerlänge. 540s: Die OM+Iso 30nM-Gruppe ist zu allen anderen Gruppen signifikant, die OM+Iso 1nM-Gruppe ist zur ZK-Gruppe signifikant, die OM-Gruppe ist zur ZK-Gruppe signifikant. 840s: Die gleichen Signifikanzen wie bei 540s. **C:** Fraktionierte Zellverkürzung (FS). 240s: Die OM+Iso 30nM-Gruppe ist zu allen anderen Gruppen signifikant. 540s: Die OM+Iso 30nM-Gruppe ist zur ZK-Gruppe signifikant, die OM+Iso 1nM-Gruppe ist zur ZK-Gruppe signifikant, die OM-Gruppe ist zur ZK-Gruppe signifikant. 840s: Die OM+Iso 1nM-Gruppe ist zur ZK-Gruppe signifikant, sowie die OM-Gruppe zur ZK-Gruppe. **D:** Zeit zum Verkürzungsmaximum (TTP). 540s: Signifikanzen zwischen OM+Iso 1nM zur OM- und ZK-Gruppe; sowie OM+Iso 30nM zur OM- und ZK-Gruppe; Signifikanz zwischen OM-Gruppe und ZK-Gruppe. 840s: Signifikanzen der OM+Iso 30nM-Gruppe zur OM+Iso 1nM- und ZK-Gruppe; der OM+Iso 1nM-Gruppe zur OM- und ZK-Gruppe, sowie der OM-Gruppe zur ZK-Gruppe. **E:** Relaxationszeit (RT) 50 % zur Baseline. 540s: Die OM-Gruppe zeigt sich signifikant zur ZK-Gruppe. 840s: die OM+Iso 1nM-Gruppe zeigt sich signifikant zur ZK-Gruppe, ebenso zeigt sich die OM-Gruppe signifikant zur ZK-Gruppe. **F:** RT<sub>90</sub> % zur Baseline. 540s: Die OM+Iso 30nM Gruppe zeigt sich signifikant zur ZK-Gruppe, ebenso die OM-Gruppe zur ZK-Gruppe. 840s: Die OM+Iso 30nM Gruppe zeigt sich signifikant zur ZK-Gruppe. **G:** Redoxstatus von NAD(P)H und FADH<sub>2</sub>. 240s: Hier eine Signifikanz zwischen der OM+Iso 1nM-Gruppe und der OM-Gruppe. **H:** Verhältnis von NAD(P)H zu FADH<sub>2</sub> als ratiometrischer Indikator des mitochondrialen Redoxstatus. Die sys. Sarkomerlänge ist von OM zu OM+Iso 1 nM gleich, während OM+Iso 30nM deutlich in der Verkürzung verstärkt ist. Selbes gilt für die dias. Länge. Das FS fällt nach Zugabe von OM 3 µM, in der OM+Iso 30nM, wieder ab. Die Relaxationszeit ist für OM allein signifikant verlängert, für die OM+Iso Gruppen gilt dies nicht. Sie relaxieren signifikant langsamer als die OM-Gruppe. Die TTP steigt über höhere [OM] auch für die Iso-Gruppen an. Der Redoxstatus verbleibt konstant. *Multiple Comparison Two-way ANOVA mit Bonferroni-Test zur statistischen Analyse; Testung aller Gruppe gegeneinander zum Zeitpunkt 120s, 240s, 540s, 840s. Vorhandene Signifikanzen zwischen einzelnen Gruppen am jeweiligen Zeitpunkt mit  $\alpha < p < 0.05$  gekennzeichnet.*

Die Experimente wurden in der Abwesenheit (OM allein) und Gegenwart von entweder 1 nM (als submaximale, eher physiologische  $\beta$ -adrenerge Stimulation) und 30 nM Iso-Konzentration (als maximale  $\beta$ -adrenerge Stimulation) durchgeführt. Als zusätzliche Zeitkontrolle (ZK) wurde eine Gruppe ohne Iso und ohne OM eingesetzt. Zur Übersichtlichkeit wird auf eine genauere Beschriftung innerhalb der Abbildung und auf die Angabe der p-Werte verzichtet. Die entsprechenden Signifikanzen sind in der Bildunterschrift einzusehen (Abbildung 33). Die systolischen und diastolischen Sarkomerlängen der ZK-Gruppe bleiben über die Zeit konstant. Durch OM kam es zu

einer konzentrationsabhängigen Zunahme der systolischen und diastolischen Sarkomerlänge sowie der TTP und der  $RT_{50}$ , während die fraktionelle Sarkomerverkürzung bei 1  $\mu\text{M}$  OM ihr Optimum erreichte und unter 3  $\mu\text{M}$  OM nicht mehr weiter zunahm (Abbildung 33A-E). Die Vorstimulation mit 1 nM Iso führte zu keiner nennenswerten Veränderung dieser Parameter, verkürzte allerdings moderat die  $RT_{50}$  gegenüber OM allein. Die Vorstimulation mit 30 nM Iso steigerte bereits vor Zugabe von OM die fraktionelle Sarkomerverkürzung. Darüber hinaus beschleunigte Iso 30 nM die  $RT_{50}$ . Durch Zugabe von OM kam es zu einer substanziellen zusätzlichen konzentrationsabhängigen Abnahme der systolischen und diastolischen Sarkomerlänge, was in einer Verringerung der fraktionellen Sarkomerverkürzung resultierte (Abbildung 33A-D). Interessanterweise war die OM-induzierte diastolische Sarkomerverkürzung in der Gegenwart von 30 nM Iso sogar stärker ausgeprägt als in der Abwesenheit oder der geringen Konzentration von Iso (1 nM; Abbildung 33B), obwohl die Kinetik der Zellverkürzung (TTP) und -verlängerung ( $RT_{50}$ ) durch 30 nM Iso in der Abwesenheit und auch der Gegenwart von OM beschleunigt wurden.

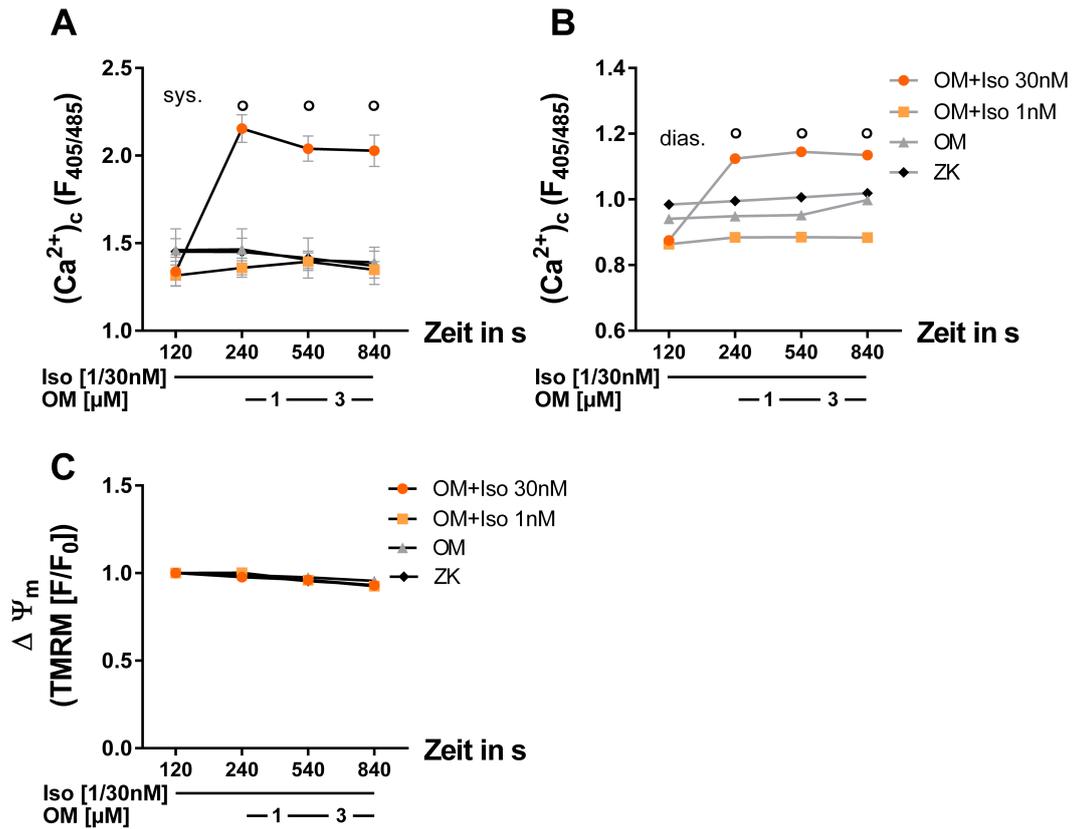
Der Redoxstatus von NAD(P)H und FAD, sowie das Verhältnis von NAD(P)H/FAD blieb für alle 4 Gruppen weitgehend konstant (Abbildung 33G und H). In der Summe wird durch eine unterschwellige  $\beta$ -adrenerge Stimulation mit Isoprenalin (1 nM), im Gegensatz zu den Ergebnissen mit Levosimendan, keine Potenzierung der Wirkung durch OM erzielt. Dies ist darauf zurückzuführen, dass für Levosimendan, aber nicht für OM, eine PDE3-inhibitorische Wirkung beschrieben ist. Bei einer stärkeren  $\beta$ -adrenergen Stimulation (30 nM Iso) ist allerdings eine Verstärkung der diastolischen Zellverkürzung bei 1 und 3  $\mu\text{M}$  OM zu beobachten. Dies führt zu einer Verringerung der durch Iso gesteigerten fraktionellen Sarkomerverkürzung. Selbst unter diesen extremen Bedingungen ist keine Oxidation des mitochondrialen Redoxstatus zu beobachten.

Während des Protokolls mit OM+Iso 30 nM fielen vermehrt spontane Zellverkürzungen auf, die wir als zelluläre Arrhythmien bezeichnen. Diese wurden in allen Gruppen in den letzten 10 Sekunden vor dem Wechsel auf eine neue Lösung quantifiziert. Es zeigt sich eine leichte Zunahme dieser Arrhythmien in der Gegenwart von 30 nM Iso allein, was durch die Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  OM bereits deutlich gesteigert wurde. Bei 3  $\mu\text{M}$  OM nahmen diese nicht weiter zu. In der Abwesenheit und Gegenwart von 1 nM Iso kam es zu keinem relevanten Auftreten von zellulären Arrhythmien (Abbildung 34).



**Abbildung 34: Protokoll 6: Arrhythmie-Score bei OM 1 µM und 3 µM von OM+Iso 30 nM (n=14); OM+Iso 1 nM (n=36); OM (n=50) und Zeitkontrolle (ZK) (n=12) über die Zeit (s);** Arrhythmien in % der Schläge gefolgt von Extrasystolen (ES) ohne ZK-Gruppe. Entstehung von Extrasystolen hauptsächlich unter Belastung mit 30 nm [Iso]. *Two-way ANOVA mit Bonferroni-Test zur statistischen Analyse; vorhandene Signifikanzen zwischen einzelnen Gruppen am jeweiligen Zeitpunkt mit  $\alpha < 0.05$  gekennzeichnet.*

Zum Abschluss der OM-Testreihe und zur besseren Einordnung im Vergleich zu Levo, wurde zusätzlich die intrazelluläre  $Ca^{2+}$  Konzentration unter OM und Iso analysiert. Hierfür wurden die Zellen mit Indo-1 AM beladen, sowie mit TMRM, um das mitochondriale Membranpotenzial ( $\Delta\Psi_m$ ) zu bestimmen. Es zeigte sich, dass es durch 30 nM, aber nicht durch 1 nM Iso zu einer deutlichen Zunahme der diastolischen und systolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen kam, die durch OM allerdings nicht weiter gesteigert wurden (Abbildung 35A und B). Das mitochondriale Membranpotential ( $\Delta\Psi_m$ ) bleibt in allen Gruppen über die Zeit konstant (Abbildung 35C).



**Abbildung 35: Protokoll 7: Intrazelluläre Calciumkonzentration  $[Ca^{2+}]_c$  und mitochondriales Membranpotential ( $\Delta\Psi_m$ ) bei 1  $\mu$ M und 3  $\mu$ M OM von OM+Iso 30 nM (n=12); OM+Iso 1 nM (n=28); OM (n=36) und Zeitkontrolle (ZK) (n=10) über die Zeit (s);**

**A:** Systolische (sys.)  $Ca^{2+}$ -Konzentration. 240s: Die OM+Iso 30 nM-Gruppe zeigt sich zu allen anderen Gruppen signifikant. 540s: Die OM+Iso 30 nM-Gruppe zeigt sich zu allen anderen Gruppen signifikant. 840s: Die OM+Iso 30 nM-Gruppe zeigt sich zu allen anderen Gruppen signifikant. **B:** Diastolische (dias.)  $Ca^{2+}$ -Konzentration. 240s: Die OM+Iso 30 nM-Gruppe zeigt sich zur OM+Iso 1 nM- Gruppe und zur OM-Gruppe signifikant. 540s: Die OM+Iso 30 nM-Gruppe zeigt sich zur OM+Iso 1 nM- Gruppe und zur OM-Gruppe signifikant. 840s: Die OM+Iso 30 nM-Gruppe zeigt sich zur OM+Iso 1 nM-Gruppe signifikant. **C:** TMRM (Tetramethylrhodaminmethylester) als ratiometrischer Indikator des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ). Die sys. und dias.  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen sind nur unter 30 nM OM+Iso signifikant erhöht. Das mitochondriale Membranpotential ( $\Delta\Psi_m$ ) zeigt einen konstanten Verlauf für alle Gruppen. *Multiple Comparison Two-way ANOVA mit Bonferroni-Test zur statistischen Analyse; vorhandene Signifikanzen zwischen einzelnen Gruppen am jeweiligen Zeitpunkt mit  $\alpha < 0.05$  gekennzeichnet. Testung aller Gruppe gegeneinander zum Zeitpunkt 120s, 240s, 540s, 840s.*

## 5 Diskussion

Bisher gibt es viele Ansätze wie man das Therapiedilemma bei akuter Herzinsuffizienz und kardiogenem Schock lösen kann. Der Durchbruch bleibt bisher noch aus. Dennoch bleibt der heutigen Forschung nichts anderes übrig, als jede Substanzoption bis ins Kleinste zu untersuchen, mögliche Stellschrauben und Stolpersteine zu identifizieren und zu modifizieren. Im Kern braucht es weitere Optionen neben der Therapie mit Katecholaminen. Dobutamin erschien zunächst als vielversprechende Substanz nach Noradrenalin und Dopamin, doch auch mit selektivstem  $\beta_1$ -AR Agonismus (vergleichbar mit Isoprenalin) verbleiben zahlreiche negative Effekte. Diese umfassen einen erhöhten myokardialer Sauerstoffverbrauch, Induktion von Hypertrophie, Entstehung von Arrhythmien, Toleranzentwicklung bei stärkerer Aktivierung des sympathischen Nervensystems (geringere Expression von  $\beta$ -AR auf der Zelloberfläche und Desensibilisierung dieser Rezeptoren), energetisches Mismatch mit Entstehung von oxidativem Stress (s. 2.3.1 *Inotropika – Übersicht*) und Induktion von Zelltodmechanismen (MAACK et al., 2019).

Hier ist ein genauer Blick auf die Signalwege auf zellulärer Ebene und der elektromechanischen Kopplung (EM-Kopplung) von Nöten. Ein Agonismus am  $\beta$ -AR auf der Zellmembran aktiviert über einen G-Protein gekoppelten Prozess die Phosphorylierung der Adenylatzyklase (AC) am Sarkolemm. Die AC phosphoryliert cAMP, das wiederum die Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert. Die PKA aktiviert zahlreiche zelluläre Prozesse, wie Steigerung der Aktivität von L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen (LTCC;  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom von extra- nach intrazellulär), der SERCA-Pumpe ( $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum (SR)), des  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstroms aus dem SR über die Ryanodinrezeptoren (RyR) und unterstützt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Desensibilisierung der Myofilamente. Erreicht nun ein Aktionspotential die Kardiomyozyte, strömen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in die Zelle ein und triggern die weitaus stärkere  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR. Dieses bindet in der Systole an Troponin C (TnC) und diffundiert in der Diastole wieder ab. Des Weiteren strömen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen über den mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Uniporter (MCU) in das Mitochondrium ein, wo sie den Citratzyklus und damit die Regeneration von  $\text{NAD}^+$  und FAD zu NADH und  $\text{FADH}_2$  mediierten, welche wiederum Elektronen an die Atmungskette abgeben und so einen Gradienten  $\Delta\Psi_m$  aufbauen, der wiederum die ATPase antreibt und ADP zu ATP synthetisiert. Darüber hinaus kann NADH sein Elektron auch an  $\text{NADP}^+$  abgeben und so über die in der IMM lokalisierte mitochondriale Transhydrogenase (NNT) NADPH herstellen. Andersherum kann NADH

sein Proton auch an  $\text{NADP}^+$  abgeben und über die NNT an der IMM NADPH herstellen. NADPH aktiviert Matrixenzyme, die die antioxidative Kapazität der Mitochondrien bilden und so  $\text{H}_2\text{O}_2$  entgiften. Dieses entsteht aus  $-\text{O}_2\cdot$ -Radikalen der Atmungskette und wird durch die Superoxid Dismutase (SOD) in der mitochondrialen Matrix in  $\text{H}_2\text{O}_2$  überführt. Kurzum, die Schlagkraft steigt (positive Inotropie), der Energieverbrauch der Zelle steigt. So fällt mehr ADP an und mehr  $\text{Ca}^{2+}$  strömt in die Mitochondrien ein. So werden mehr NAD(P)H und FADH<sub>2</sub> regeneriert und stehen für die Elektronenabgabe an die Atmungskette oder antioxidative Enzyme bereit. Ausführlicher ist dies im Abschnitt 2.1.4 Mitochondriale Energetik nachzulesen. Dies bezeichnet man als parallele Aktivierung mit vermehrtem Sauerstoffverbrauch und höheren  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten. In Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz ist diese parallele Aktivierung, hinsichtlich der mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme, gestört (genauer im Abschnitt 2.2 *Herzinsuffizienz*). Dies stellt den zentralen Kern der Forschung in unserer Arbeitsgruppe dar, denn was geschieht nun beim Krankheitsbild der Herzinsuffizienz auf zellulärer Ebene? Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in das SR in der Diastole wird reduziert. Die Expression und Aktivität der SERCA-Pumpen nehmen ab. Wodurch sich die Diastole, zusätzlich zum langsameren Ausschleusen von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem NCX am Sarkolemm, verlängert. Es entsteht ebenso ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck im RyR2 mit ungewünschtem  $\text{Ca}^{2+}$ -Verlust ins Zytosol und damit geringeren systolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten. Dieses  $\text{Ca}^{2+}$  fehlt wiederum an den Myofilamenten. Zusätzlich kann eine erhöhte diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration spontane  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungen aus dem SR triggern und ventrikuläre Arrhythmien verursachen (MAACK et al., 2019).

## 5.1 Levosimendan

Um in vorgeschädigten kardialen Myozyten den negativen Einfluss der Katecholamine zu umgehen, entstand in den 1980er Jahren die Gruppe der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitizer, deren Zielstruktur die Myofilamente direkt sind. Die Beziehung zwischen intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und Schlagkraft wird nach links verschoben. Die Schlagkraft ist demnach bei jeder gegebenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration höher. Man hoffte auf weniger Arrhythmien und weniger Energieverbrauch bei besserer kardialer Funktion. Im Falle von Levosimendan soll die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an TnC stabilisiert und damit die Bindung von TnC an TnI (Troponin I) verlängert werden. Dies steigert die Kontraktionskraft (POLLESELLO et al., 1994). Levosimendan zeigt in Meerschweinchen-Kardiomyozyten eine konzentrationsabhängige Zunahme der systolischen Sarkomerverkürzung. Die diastolische Zellverkürzung zeigt sich, im Vergleich zur

Vehikelkontrolle, nicht verändert. Bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitizern ist die diastolische Relaxation beeinträchtigt, da die systolische Kontraktionsverstärkung auf Kosten der diastolischen Relaxationszeit geht. Levosimendan ist kein reiner  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitizer. Es hat in der Tat einen nicht zu vernachlässigenden PDE3 inhibitorischen Effekt. (PDE3 > PDE4; 1000:1) Die Phosphodiesterasen bauen cAMP im zellulären katecholaminergen Signalweg ab. Bei Inhibition der PDE3 wird die  $\beta$ -adrenerge Stimulation durch vermehrten Anfall des cAMP sogar noch geboostert, statt wie ursprünglich erhofft unter Levosimendan, ohne Aktivierung eben dieses Signalwegs zu wirken. Um dies im Falle der inotropen Wirkung von Levosimendan zu untersuchen, ist eine unterschwellige  $\beta$ -adrenerge Vorstimulation von Nöten (ØRSTAVIK et al., 2014). Levo zeigt bei unterschwelliger Vorstimulation mit Isoprenalin eine signifikant gesteigerte systolische myofilamentäre Verkürzung, die konzentrationsabhängig ansteigt. Die fraktionelle Zellverkürzung ist schon bei geringeren Levo-Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  signifikant zur alleinigen Anwendung von Isoprenalin erhöht. Auch hier ist keine relevante Wirkung auf die diastolische Verkürzung zu verzeichnen, eher eine Verbesserung der diastolischen Kinetik. Dies bestärkt die Theorie der vordergründigen PDE3-inhibitorischen Wirkung. Dennoch finden sich in der Literatur Quellen, die den Wirkmechanismus von Levosimendan anders einordnen. Wie bereits erwähnt, hat die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration Einfluss auf die Bindung zwischen Levo und TnC. Eine Hypothese besagt, dass Levo bei diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen nur eine milde Interaktion mit den Myofilamenten eingeht; erst unter höhere Konzentrationen in der Systole wird eine TnC-Bindung möglich (Calcium-abhängige Sensibilisierung der Myofilamente). In der Diastole würde durch Dissoziation vom TnC keine Veränderung in der Relaxationszeit zu verzeichnen sein (POLLESELLO et al., 1994; HAIKALA et al., 1995b). Dies geschähe im Sinne einer Schlag-zu-Schlag Bindung und Abdiffusion im Mikrosekunden-mikromolaren Bereich. Diese Theorie erscheint dennoch eher unwahrscheinlich (MAACK et al., 2018). Wir sehen, dass die Kontraktilitätssteigerung linear zu aufsteigenden Levo-Konzentrationen und damit höherem Anfall von cAMP ist. Zudem ist die Wirkung von Levo durch die Anwendung von Carbachol, einem cAMP Regenerationsinhibitor, aufzuheben (BOKNÍK et al., 1997).

Bei der bioenergetisch parallelen Aktivierung (wie oben beschrieben) verbleibt der Redoxstatus bei gesteigerter kardialer Leistung ausgeglichen. Dies geschieht durch stärkere Induktion des Citratzyklus durch  $\text{Ca}^{2+}$  und vermehrtem ADP-Anfall. Levosimendan zeigte in unseren Messungen generell keine Auswirkungen auf NADH/FADH<sub>2</sub>. Der Redoxstatus bleibt unter Vorstimulation mit Isoprenalin konstant,

Isoprenalin als  $\beta$ -adrenerger Agonist aktiviert primär den parallelen Signalweg. Doch wir sehen auch, dass Levo allein, selbst in geringen Konzentrationen keinen Einfluss auf den Redoxstatus ausübt. In der Literatur finden sich Aussagen, die nahelegen, dass Levo in niedrigen Konzentrationen einen  $\text{Ca}^{2+}$  sensibilisierenden Effekt habe, aber durch Überlappung beider Aktivitäten nicht leicht voneinander differenzierbar ist (EDES et al., 1995; LANCASTER, COOK, 1997; HASENFUSS et al., 1998). Durch den PDE-inhibitorischen Effekt fällt mehr cAMP an und die PKA wird vermehrt phosphoryliert. Wie bereits beschrieben, steigt die intrazelluläre systolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration.

Im nächsten Schritt galt es festzustellen, ob Levo einen Einfluss auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Flüsse hat. Bei reinen  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitizern wird der  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt der Kardiomyozyten nicht beeinflusst. ADP fällt zwar vermehrt an,  $\text{NAD}^+$  und FAD werden aber nicht verstärkt reduziert. Somit wird kein größerer Protonengradient an der Atmungskette aufgebaut, soweit die Theorie. Was in früheren *in vitro* Studien festgestellt wurde, ist, dass nun die Wirkung der NNT-Pumpe an der IMM rückwärts abläuft (NICKEL et al., 2015). Statt  $\text{NADP}^+$  aus  $\text{NADH}$  zu regenerieren, fungiert hier  $\text{NADPH}$  als Protonengeber und reduziert das  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}$ , das wiederum Elektronen an die Atmungskette abgibt. Durch das nun oxidierte  $\text{NADP}^+$  sinkt die antioxidative Kapazität der Mitochondrien und  $\text{H}_2\text{O}_2$  kann nicht ausreichend entgiftet werden. Oxidativer Stress fällt an, um das bioenergetische Mismatch auszugleichen (Abbildung 12). Dies wurde in Arbeiten der Arbeitsgruppe (noch unpubliziert) zum Beispiel beim Krankheitsbild der hypertrophen Kardiomyopathie (HCM) gesehen, wo die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensibilität der Myofilamente durch einen genetischen Defekt erhöht ist. Hier wird durch diese Sensibilisierung und  $\beta$ -adrenerge Stimulation ein energetisches Defizit mit erhöhtem oxidativen Stress generiert. Diese reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) induzieren am sarkoplasmatischen Retikulum eine spontane  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung in sogenannten  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen, welche Trigger für Arrhythmien sind. In der anschließenden Reaktion erhöhen ROS die intrazelluläre diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und oxidieren den RyR2. Zudem wird die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase am SR inhibiert. Ebenso wird der sarkolemmale  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher angetrieben und damit die  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung am SR. Auch dies fördert Arrhythmien und zusätzliche, abnorme APs. ROS sind ebenso ursächlich für systolische Dysfunktion, Nekrose und vorzeitigen Tod (NICKEL et al., 2015). Dies legt nahe, dass ROS ungünstige Effekte auf die elektromechanische Kopplung und das kardiale Remodeling bei Herzinsuffizienz haben. Auch wenn in dieser Studie keine ROS direkt gemessen wurden, so ist aufgrund früherer Arbeiten der Gruppe

(KOHLHAAS, MAACK, 2010) davon auszugehen, dass bei Ausbleiben einer relevanten Oxidation von NAD(P)H auch keine vermehrte mitochondriale ROS Emission zu erwarten ist. Die Stabilität des NAD(P)H Redoxstatus wird hierbei a.e. auf eine adäquate parallele Aktivierung von Zellverkürzung und Citratzyklus-Dehydrogenasen zurückgeführt, da durch Levosimendan in der Gegenwart einer geringen  $\beta$ -adrenergen Stimulation eben auch die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ansteigt. Auch die Stabilität des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ) zeigt ein stabiles bioenergetisches Feedback an.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Wirkung von Levosimendan eher durch PDE3-Inhibition, als über eine Sensibilisierung der Myofilamente für  $\text{Ca}^{2+}$  vermittelt wird. Die Steigerung der Sarkomerverkürzung wird primär über eine Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Amplitude vermittelt, die parallel die mitochondriale Energetik mit ADP induziert. Bioenergetisch zeigt sich die Substanz demnach neutral.

Zum Abschluss wird noch die Brücke zur Klinik geschlagen. Eine kurzfristige intravenöse Infusion mit Levosimendan sollte im klinischen Alltag bei niedrigem systolischem Blutdruck ( $< 90$  mmHg), Hypoperfusion und Stauung in Erwägung gezogen werden. Bei niedrigem mittlerem arteriellem Druck ist Levo in Kombination mit einem Vasokonstriktor (a.e. Noradrenalin) zu empfehlen, sowie bei vorangegangener  $\beta$ -Blocker Therapie und daraus verschlimmerten Hypotension und Hypoperfusion, da Levo diese Effekte aufhebt (ESC GUIDELINES, 2016). Durch die vasodilatatorischen Eigenschaften ist es mit einer Senkung der Vor- und Nachlast (HARKIN et al., 1995) und einer Steigerung der koronararteriellen Perfusion assoziiert (LILLEBERG et al., 1998). Durch diese so verbesserte myokardiale Gewebsperfusion und die Minimierung von Infarktarealen (anti-ischämischer Effekt), sowie durch Eröffnung von mitochondrialen ATP-sensitiven  $\text{K}^+$ -Kanälen zeigt sich Levo kardioprotektiv (KERSTEN et al., 2000; KOPUSTINSKIENE et al., 2004; SONNTAG et al., 2004; DE LUCA et al., 2005; GARCÍA-GONZÁLEZ et al., 2006; TRITAPEPE et al., 2006; ERIKSSON et al., 2009). Auch für die Langzeitwirkung in Bezug auf kardiales Remodeling, Apoptose und myokardiale Inflammation zeigten präklinische Studien gute Ergebnisse (MAYTIN, COLUCCI, 2005; PARISSIS et al., 2005; LOUHELAINEN et al., 2007; GROSSINI et al., 2010; CAIMMI et al., 2011). Die protektiven Effekte sind nicht nur auf das Herz begrenzt. Es konnten auch positive Effekte auf Leber, Nieren, Gehirn, Lungen, Mesenterien und Magenschleimhaut verzeichnet werden (PAGEL et al., 1996; SCHWARTE et al., 2005; YILMAZ et al., 2007; ZEMLJIC et al., 2007; LEPPIKANGAS

et al., 2008). Diese neurohumoralen Veränderungen sind Teil eines immunmodulatorischen Profils mit kardioprotektiven Eigenschaften zusätzlich zu den molekularen Angriffspunkten. Die inotropen und vasodilatatorischen Effekte werden durch dieses neurohumorale Profil komplettiert (IKONOMIDIS et al., 2007). Die Frage ist, warum die Ergebnisse vieler klinischer Studien hinsichtlich des Überlebensvorteils zwischen signifikantem (FOLLATH et al., 2002; MOISEYEV et al., 2002), neutralem, oder keinem Vorteil differieren (CLELAND et al., 2006). Mögliche relevante Einflussfaktoren stellen die Heterogenität der Patientenpools mit Faktoren wie Hypotension, Arrhythmien und paralleler pharmakologischer Therapie dar. Ungeachtet vieler anderer Ergebnisse zeigen Metaanalysen von Levo, im Vergleich zu Dobutamin, eine Verbesserung des klinischen Behandlungserfolgs bei kritisch kranken Patienten (verbesserte hämodynamische Parameter; signifikante Mortalitätssenkung um 20%) (DELANEY et al., 2010; LANDONI et al., 2010a). Auch die Überlebensquote von Patienten bei kardialen Eingriffen wird verbessert (LANDONI et al., 2010b; MAHARAJ, METAXA, 2011). Der initiale Optimismus wurde zunächst von der großen LIDO-Studie über kurzzeitig klinische Verbesserung bei dekompensierter oder akuter HI nach Myokardinfarkt und später auch in der RUSSLAN-Studie erzeugt (FOLLATH et al., 2002; MOISEYEV et al., 2002). Um dann wiederum durch die Ergebnisse der SURVIVE- und REVIVE-Studien geschmälert zu werden. Hier wurde der Langzeiteffekt von Levo im Vergleich zu Dobutamin untersucht. Es zeigte sich unter Levo keine Verbesserung der Mortalität gegenüber der Behandlung mit Katecholaminen. Die oben beschriebenen kardioprotektiven Faktoren, wie NT-pro-BNP-Reduktion und hämodynamische Vorteile, konnten beobachtet werden (MEBAZAA et al., 2009). In der neusten LION-HEART Studie wurde an einem Patientenkollektiv mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz mit einer 12-wöchigen Infusionslaufzeit ein Rückgang des NT-pro-BNP, eine Verbesserung der Lebensqualität und eine geringere Hospitalisierungsrate gezeigt (COMÍN-COLET et al., 2018). Ob Levo als Hybrid von PDE3-Inhibition und  $Ca^{2+}$ -Sensibilisierung zum Beispiel auch im ambulanten Rahmen bei Patienten mit  $\beta$ -Blocker Therapie Überlebensvorteile bietet, müssen zukünftige Forschungen feststellen.

## 5.2 Omecamtiv Mecarbil

Aktuell im klinischen Alltag zugelassene und eingesetzte Inotropika sind kardiale Glykoside, Katecholamine (insb. Dobutamin und Noradrenalin), PDE-Inhibitoren und Levosimendan als Hybrid. Als erste Substanz einer neuen Gruppe wurde 2005

Omecamtiv Mecarbil (OM) entwickelt, dessen Wirkmechanismus selektiv auf eine Aktivierung der Myosin ATPase an den Myofilamenten gerichtet ist. Es wird dabei kein Einfluss auf die Kontraktionsfrequenz ausgeübt, sondern gezielt auf die Kontraktionsamplitude. Wie bereits im Abschnitt 2.3.3 Omecamtiv Mecarbil ausführlich beschrieben wurde, interagiert OM mit der  $\beta$ -kardialen Motordomäne des Myosins und verändert die Konstitution der Aktin-Bindungsstelle. Es folgt eine höhere Umsetzung der schwachen in eine starke Aktin-Myosin Bindung. Vorstellen kann man sich dies vereinfacht anhand von mehr Händen, die an einem Seil ziehen und somit mehr Kraft ausüben können (MALIK et al., 2011). Diese länger anhaltende Aktin-Myosin-Bindung verschiebt sich marginal in die Diastole, wenn die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bereits wieder abfällt (MAACK et al., 2019). Die ideale Plasmakonzentration *in vivo* liegt bei etwa 1  $\mu\text{mol/L}$ , sodass wir mit Konzentrationen von 0.01 – 30  $\mu\text{M}$  bewusst eine große Spannbreite abdecken (MORGAN et al., 2010). Wir beobachteten, dass OM in aufsteigenden Konzentrationen proportional stärker die systolische Zellverkürzung erhöht. Die diastolische Zellverkürzung nimmt ebenfalls mit steigenden OM-Konzentrationen stetig zu. Wie bereits bei den  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitizern beschrieben, erhöht sich die systolische Kontraktionsverstärkung auch hier auf Kosten der diastolischen Relaxationsfähigkeit, was man anschaulich in Abbildung 32 nachvollziehen kann. Die Kardiomyozyten sind ab einer bestimmten OM-Konzentration nicht nur in der Relaxationszeit verlangsamt, sondern auch prä systolisch stärker vorgespannt. Eine diastolische Dysfunktion entsteht und die Amplitude der absoluten Zellverkürzung sinkt. Innerhalb einer Konzentrationsspanne von 1 bis 3  $\mu\text{M}$  halten sich diese systolischen Vor- und diastolischen Nachteile die Waage.

Patienten mit akuter HI sind physiologischem Stress ausgesetzt. Durch diese endogene katecholaminerge Stimulation ist der  $\beta$ -adrenerge Signalweg aktiviert, wodurch die Amplitude und Kinetik der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen gesteigert werden. Um diesen Zustand auf unsere *in vitro* Untersuchungen zu übertragen, stimulierten wir die Zellen, wie zuvor bei Levo, mit Isoprenalin. Bisher ist noch keine OM induzierte Aktivierung von adrenergen zellulären Signalwegen bekannt (ØRSTRAVIK, 2015), eine mögliche Demaskierung wäre vorstellbar. Des Weiteren muss geprüft werden, ob die diastolische Dysfunktion unter OM durch den positiv lusitropen Effekt von Katecholaminen abgemildert werden kann. Wir konnten zeigen, dass es zunächst zu keiner systolischen Kontraktionsverstärkung unter OM mit einer unterschwelligen,  $\beta$ -adrenergen Vorstimulation (1nM Iso) kommt. Die diastolische Verkürzung ist idem zur singulären OM Anwendung. Hier findet sich keine

Auslöschung oder Abmilderung der diastolischen Dysfunktion. In Kombination mit hohen Iso-Konzentrationen (30nM) verstärkt sich die systolische Sarkomerverkürzung massiv, so auch die diastolische Verkürzung. Es ist interessant, dass unter hoher Stressinduktion die diastolischen Defekte erst in Kombination mit OM stärker ausgeprägt erscheinen. Unter hohen Iso-Konzentrationen allein zeigen die Kardiomyozyten kein diastolisches Defizit. Zusätzlich konnten wir feststellen, dass bei hoher Stressinduktion der Kardiomyozyten vermehrt Arrhythmien auftraten, unter Katecholaminen in dieser verwendeten Konzentration nicht ungewöhnlich. Die Anzahl der zellulären Extraschläge wurde allerdings durch die Hinzugabe von OM deutlich erhöht.

Um auszuschließen, ob eine Disbalance im Redoxhaushalt mit vermehrter ROS Produktion ursächlich für diese weniger förderliche Zellkinetik ist (Verstärkung der diastolischen Dysfunktion und Entstehung von Arrhythmien), gilt es erneut einen Blick auf die mitochondriale Energetik zu werfen. Wie bereits oben beschrieben, agiert OM direkt an den Myofilamenten. Auf der Ebene der elektromechanischen Kopplung soll es zu keiner Beeinflussung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushaltes kommen (MALIK et al., 2011). Folglich bleibt ein vermehrtes Antreiben des Citratzyklus in den Mitochondrien aus. Das entscheidende Puzzlestück ist das ATP. Würde dieses unter OM vermehrt zu ADP umgesetzt werden und dieses viele vermehrt an, käme es zu der bekannten mitochondrialen Disbalance mit Oxidation von NADH, NAD(P)H und  $\text{FADH}_2$ . Dies würde wiederum die Reduktion der antioxidativen Kapazität der Kardiomyozyten antreiben und negative Effekte wie Arrhythmien, Remodeling, Nekrosen und Zelltod begünstigen. Diesen Effekt stellten wir unter OM nicht fest. Kurzgesagt verblieb der Redoxstatus, selbst in toxischen OM-Konzentrationen, ausgeglichen und zeigte auch keine Tendenz zur Oxidation. Ebenfalls unter unterschwelliger  $\beta$ -adrenerger Kostimulation sowie unter hoher Stressinduktion war kein Effekt auf diese Parameter zu verzeichnen. Der Effekt von Omecamtiv kann somit von dem Effekt anderer, konventioneller  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitizer abgegrenzt werden, da z. B. durch den klassischen Sensitizer EMD-57033 eine Oxidation des Redoxstatus von NAD(P)H und FAD sowie eine erhöhte Emission von ROS hervorgerufen wurde (unpublizierte Daten der Arbeitsgruppe).

Im Gegensatz zu Levosimendan gibt es für OM keine Hinweise auf eine PDE3-inhibitorische Aktivität. In der Gegenwart einer subtherapeutischen Konzentration von Isoprenalin kam es zu keiner Potenzierung der Sarkomerverkürzung und auch keinem

Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. OM allein zeigte ebenfalls keinen Effekt auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Flüsse. Auch das parallel gemessene mitochondriale Membranpotential blieb stabil. Dies weist darauf hin, dass OM keine direkten Einflüsse auf die mitochondriale Energetik hat und seine Effekte auf die Sarkomerverkürzung ausschließlich durch Ansetzen an den Myofilamenten und nicht adrenergen und/oder  $\text{Ca}^{2+}$ -transportierenden Prozessen ausübt.

Werden die Ergebnisse zusammengefasst, hat OM keine PDE-inhibitorische Eigenschaften. Es lässt sich keine Beeinflussung des  $\beta$ -adrenergen Signalwegs feststellen. Durch die ausgeglichene mitochondriale Energetik kann man schließen, dass OM zwar isoliert den Kraftschlag der Myosinköpfchen erhöht, die Konzentration an ADP hierbei nicht ansteigt und kein Einfluss auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Flüsse besteht. Die therapeutische Breite ist wegen der Ausbildung einer diastolischen Dysfunktion limitiert, da diese die Füllung des linken Ventrikels beeinträchtigt. Innerhalb der Konzentrationsgrenzen erscheint die kardiale Arbeit effektiver. Ob absolut mehr Sauerstoff verbraucht wird und ob mehr ROS entsteht, müssen zukünftige Studien final aufdecken, denn in der Vergangenheit zeigten verschiedene Modelle gravierend differente Ergebnisse. In einem post-ischämischen Schweinemodell (n=7) wurde eine Steigerung der systolischen Ejektionszeit (SET) und der Ejektionsfraktion (EF), bei signifikant erhöhtem Sauerstoffverbrauch der Kardiomyozyten, beobachtet (BAKKEHAUG et al., 2015). In einem Hundemodell konnte kein signifikanter Mehrumsatz von Sauerstoff gemessen werden. Die SET und das SV zeigten sich gesteigert, mit gleichzeitig gesunkener HF und SVR, a.e. durch geringere sympathische Aktivierung (SHEN et al., 2010).

In klinischen Ansätzen bei gesunden Probanden und Patienten mit stabiler HI zeigten sich oben genannte Effekte (SET, SV, EF Steigerung und gesunkene HF) weniger ausgeprägt (CLELAND et al., 2011a). In Gruppen mit hohen verabreichten OM-Konzentrationen von 1200 ng/ml, jenseits der therapeutischen Breite von 100-500 ng/ml, wurden pektanginöse Beschwerden, EKG-Veränderungen und Troponin-Erhöhungen beobachtet. Dies wurde auf eine exzessiv gesteigerte SET, verlängerte Systole und deutlich verkürzte Diastole und damit Abnahme der Koronarperfusion zurückgeführt (CLELAND et al., 2011b; TEERLINK et al., 2011). Neuere Studien steuerten fortan OM-Konzentrationen < 1000 ng/ml an. Bei Patienten mit akuter HI und LVEF < 40% zeigte sich in der ATOMIC-HF Studie keine Verbesserung der Dyspnoe, außer in Gruppen, die eine höhere Dosierung erhielten. Auch hier wurde die

SET verlängert. Die HF zeigte sich leicht gesunken und der systolische Blutdruck erhöht (TEERLINK et al., 2016a). In der oralen Anwendung bei chronischer HI (COSMIC-HF), zeigte OM über 20 Wochen ein sicheres Anwendungsprofil und eine Senkung des NT-ProBNP bei leicht verbesserter SET, SV und HF-Senkung, was auf eine geringere endogene sympathische Aktivierung hindeutet. Es traten unabhängig von der OM-Plasmakonzentration leichte Troponin I Anstiege auf (TEERLINK et al., 2016c). Um dies zu komplettieren, wurden in der GALACTIC-HF Studie 8000 Patienten mit HFrEF eingeschlossen. Hier zeigte sich ein besserer Nutzen für ein recht eingeschränktes Patientenkollektiv mit fortgeschrittener HFrEF und niedriger LVEF, wo OM die kardiovaskuläre Sterblichkeit und Hospitalisierungsrate signifikant reduzierte. Genauer nachzulesen ist dies im Abschnitt 2.3.3 Omecamtiv Mecarbil (TEERLINK et al., 2020). Die Zulassung der Substanz zur Therapie der Herzinsuffizienz ist beantragt.

### 5.3 Grenzen der Methoden

Generell ist der Rückschluss von *in vitro* Untersuchungen auf die klinische Anwendung begrenzt. Weitere Effekte von Levo, so z.B. die vasodilatative Wirkung, sind von unserem Modell losgelöst und können keinen Effekt auf die Myozyten ausüben, was systemisch *in vivo* mit Vorlasterniedrigung, Mikrozirkulationsproblemen, etc. eine Veränderung der Bedingungen darstellt. Ganzheitliche Effekte unter OM können ebenso nicht beurteilt werden, so etwa die EF, die Schlagfrequenz, etc.

### 5.4 Fazit & Ausblick

Therapeutika, die Fehler im  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt im insuffizienten Herzen ausgleichen, sind, ohne Aktivierung der  $\beta$ -adrenergen Signalwege, vielversprechende Forschungsansätze. Sie verhindern zum einen bioenergetische Defizite mit einer möglichen Exazerbation einer diastolischen Dysfunktion (wie ausgelöst durch pure  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitizer) und zum anderen Langzeiteffekte wie kardiales Remodeling. Die Entwicklung direkter Aktivatoren der sarkomerischen Motorproteine ist ein schnell wachsendes Feld und sollte idealerweise Lösungen therapeutischer Probleme bringen (MAACK et al., 2018). Die Substanz Nitroxyl (HNO) zum Beispiel wird von der NO-Synthase unter oxidativem/ nitrosativem Stress synthetisiert. Sie hat keinen Einfluss auf cAMP- und cGMP-Konzentrationen und soll die Konstitution von Aktin-Tropomyosin und den Myosin-Schwerketten verändern (PAOLOCCI et al., 2001;

PAOLOCCI et al., 2003). Hierdurch erhöht sich die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensibilität der Myofilamente. Es verändert zudem die inhibitorische Beziehung zwischen Phospholamban und der SERCA-Pumpe. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme ins SR erhöht sich. In Kardiomyozyten zeigt sich eine Steigerung der fraktionierten Zellverkürzung und der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten, ohne die cAMP-Konzentration zu beeinflussen (TOCCHETTI et al., 2007). Eine Substanz dieser Gruppe ist CXL-1020. Es zeigt in Patienten mit systolischer HI eine Reduktion von LV und RV Füllungsdrücken bei erhöhtem SV. Der SVR erscheint reduziert. Die HF wird nicht beeinflusst (SABBAH et al., 2013). Aktuell wird die neuste Generation mit der Substanz CXL-1427 in Phase 1 und 2 Studien getestet (NCT02157506, NCT02819271).

Besondere Beachtung kommt den Mitochondrien als Ansatzpunkt der Untersuchungen zu. Als Hauptakteure der oxidativen Phosphorylierung und als wichtiger Teil des Zellmetabolismus rücken sie zunehmend ins Licht der experimentellen Forschung. Durch ihre Mitsteuerung des Zelltods, der Neoplasieentstehung, der Zelldifferenzierung, des Immunsystems, der Sauerstoffmessung, sowie des Calciumhaushalts, stellen sie eine wichtige neue therapeutische Angriffsstelle dar (SMITH et al., 2012). So z.B. SS-31, eine Substanz, die an Cardiolipin bindet. Cardiolipin ist verantwortlich für die Cristae-Formation der IMM und eine Zusammenlagerung der Komplexe der Atmungskette als „Superkomplex“. Es schirmt die Zelle so vor Schädigung durch ROS ab und erhält die Funktion der Atmungskette (SZETO, 2014). Es soll sogar der Entstehung von Arrhythmien, systolischer und diastolischer HI vorbeugen und kurz- und langfristig die Pumpfunktion verbessern (DAI et al., 2011; DAI et al., 2013; NICKEL et al., 2015; SABBAH et al., 2016). Auch andere Substanzen scheinen durch Optimierung der mitochondrialen Energetik die kardiale Funktion zu verbessern. So Trimetazidin, ein Hemmer der  $\beta$ -Oxidation des Fettsäuren-Metabolismus. Es shiftet den Energiegewinn in Richtung Glukoseoxidation, der weniger Sauerstoff pro ATP-Generierung erfordert. In Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie erhöhte es nach 15 Tagen die LVEF und nach 90 Tagen zusätzlich den Phosphokreatin/ ATP-Quotienten, was einen Schutz des Myokards vor hochenergetischen Phosphatlevels darstellt (FRAGASSO et al., 2003; FRAGASSO et al., 2006). Elamipretide (auch als Bendavia oder MTP-131 bezeichnet) akkumuliert im Mitochondrium und bindet ebenfalls an Cardiolipin. Es erhöht den ATP-Umsatz und reduziert die Entstehung von ROS. Perhexillin, eine andere Substanz aus demselben Formenkreis, inhibiert die Aufnahme von Fettsäuren ins Mitochondrium. Es verbesserte u.a. die Hämodynamik, die LVEF, den maximalen Sauerstoffverbrauch,

sowie die kardiale Funktion unter basalem und maximalem Stress (LEE et al., 2005; BEADLE et al., 2015). Der genaue Wirkmechanismus ist noch nicht entschlüsselt (GEORGE et al., 2016). Auch eine Verbesserung des Eisenhaushalts soll die mitochondrialen Funktionen bei Patienten mit HI verbessern. In insuffizienten Herzen ist der myokardiale Eisenspeicher reduziert. Dies ist assoziiert mit geringerer Enzymaktivität der Citratzyklus-Dehydrogenasen, sowie mit einer geringeren Expression von antioxidativen Enzymen (MELENOVSKY et al., 2017).

In einer Veröffentlichung von Januar 2019 werden weitere neue Errungenschaften zusammengefasst. Sie könnten nach weiteren klinischen Studien wertvolle Therapeutika darstellen. Einen kurzen Überblick bietet Tabelle 34.

Name	Wirkmechanismus	Phase der klinischen Studien
Ularitide	Urodilatin Analogon; Unterstützt die Diurese und Natriurese durch Bindung an NPR-A-Rezeptor	Phase 3
Serelaxin	Relaxin-Familie; Stimuliert die NO-Produktion; Steigert den kardialen Auswurf bei gleichzeitiger Senkung des SVR via RXFP-Rezeptoren (G-Protein gekoppelt)	Phase 3b
Tolvaptan	Oraler V2-Rezeptor Antagonist; Unterstützt die Wasserausscheidung ohne Erhöhung der Elektrolytkonzentration im Urin	Phase 3
CT-1	Fördert vorteilhaft das reversible kardiale Remodeling Improves Ca <sup>2+</sup> balance in the heart, which leads to recovery of cardiac contraction and relaxation	-
SERCA2a	Verbessert den Ausgleich des kardialen Ca <sup>2+</sup> -Haushalts was zu einer Erholung der Kontraktion und Relaxation führt	Phase 2

**Tabelle 34: Überblick über neue therapeutische Methoden bei Herzinsuffizienz mit entsprechendem Wirkmechanismus und aktuellem klinischen Entwicklungsstadium.**

(MACHAJ et al., 2019)

Zukünftige Forschungen sollten auf das Zusammenspiel der elektromechanischen Kopplung und der mitochondrialen Energetik abzielen. Bisher gibt es schon viele neue Ansätze, die die Entwicklung weiterer Substanzen vorantreiben werden, sodass die Therapie der akuten Herzinsuffizienz in Zukunft verbessert werden kann.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Ajiro Y, Hagiwara N, Katsube Y, Sperelakis N, Kasanuki H (2002) Levosimendan increases L-type Ca<sup>2+</sup> current via phosphodiesterase-3 inhibition in human cardiac myocytes. *Eur J Pharmacol* 2 435(1):27-33.
2. Ambrosy AP, Fonarow GC, Butler J, Chioncel O, Greene SJ, Vaduganathan M, Nodari S, Lam CSP, Sato N, Shah AN, Gheorghiade M (2014) The Global Health and Economic Burden of Hospitalizations for Heart Failure: Lessons Learned From Hospitalized Heart Failure Registries. *Journal of the American College of Cardiology* 63:1123-1133
3. Archan S, Toller W (2008) Levosimendan: current status and future prospects. *Current Opinion in Anaesthesiology* 21(1):78–84, FEB 2008
4. Aroundas AA, Hobai IA, Tomaselli GF, Winslow RL, O'Rourke B (2003) Role of Sodium-Calcium Exchanger in Modulating the Action Potential of Ventricular Myocytes From Normal and Failing Hearts. *Circ Res* 93:46-53
5. Bakkehaug JP, Kildal AB, Engstad ET, Boardman N, Næsheim T, Rønning L, Aasum E, Larsen TS, Myrmet T, How O-J (2015) Myosin Activator Omecamtiv Mecarbil Increases Myocardial Oxygen Consumption and Impairs Cardiac Efficiency Mediated by Resting Myosin ATPase Activity. *Circulation: Heart Failure* 8:766-775
6. Beadle RM, Williams LK, Kuehl M, Bowater S, Abozguia K, Leyva F, Yousef Z, Wagenmakers AJM, Thies F, Horowitz J, Frenneaux MP (2015) Improvement in Cardiac Energetics by Perhexiline in Heart Failure Due to Dilated Cardiomyopathy. *JACC: Heart Failure* 3:202-211
7. Behrends JC, Bischofberger J, Deutzmann R, Ehmke H, Frings S, Grissmer S, Hoth M, Kurtz A, Leipziger J, Müller F, Pedain C, Rettig J, Wagner C, Wischmeyer E (2017). *Physiologie* (Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag)
8. Belletti A, Castro ML, Silvetti S, Greco T, Biondi-Zoccai G, Pasin L, Zangrillo A, Landoni G (2015) The Effect of inotropes and vasopressors on mortality: a meta-analysis of randomized clinical trials. *British Journal of Anaesthesia* 115:656-675
9. Bernstein D, Fajardo G, Zhao M (2011) THE ROLE OF  $\beta$ -ADRENERGIC RECEPTORS IN HEART FAILURE: DIFFERENTIAL REGULATION OF CARDIOTOXICITY AND CARDIOPROTECTION. *Prog Pediatr Cardiol* 31:35-38
10. Bers DM (2006) Altered Cardiac Myocyte Ca Regulation In Heart Failure. *Physiology* 21:380-387
11. BfArM BfAuM- (2009) Core Safety Profile.
12. Blinks JR, Endoh M (1986) Modification of myofibrillar responsiveness to Ca<sup>++</sup> as an inotropic mechanism.[Miscellaneous]. *Circulation* 73 (Supplement III):III-85-III-98
13. Bokník P, Neumann J, Kaspareit G, Schmitz W, Scholz H, Vahlensieck U, Zimmermann N (1997) Mechanisms of the Contractile Effects of Levosimendan in the Mammalian Heart. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 280:277-283
14. Braun J, Müller-Wieland D (2017) *Basislehrbuch Innere Medizin*. 6. Auflage
15. Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, Cubicciotti RS, Sageman WS, Lurie K, Billingham ME, Harrison DC, Stinson EB (1982) Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med* 307:205-211
16. Caimmi PP, Molinari C, Uberti F, Micalizzi E, Valente G, Mary DASG, Vacca G, Grossini E (2011) Intracoronary levosimendan prevents myocardial ischemic

- damages and activates survival signaling through ATP-sensitive potassium channel and nitric oxide. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 39
17. Chang W, Xie JF, Xu JY, Yang Y (2018) Effect of levosimendan on mortality in severe sepsis and septic shock: a meta-analysis of randomised trials. *BMJ Open* 8:e019338
  18. Chen HH, Anstrom KJ, Givertz MM, Stevenson LW, Semigran MJ, Goldsmith SR, Bart BA, Bull DA, Stehlik J, LeWinter MM, Konstam MA, Huggins GS, Rouleau JL, O'Meara E, Tang WH, Starling RC, Butler J, Deswal A, Felker GM, O'Connor CM, Bonita RE, Margulies KB, Cappola TP, Ofili EO, Mann DL, Dávila-Román VG, McNulty SE, Borlaug BA, Velazquez EJ, Lee KL, Shah MR, Hernandez AF, Braunwald E, Redfield MM (2013) Low-dose dopamine or low-dose nesiritide in acute heart failure with renal dysfunction: the ROSE acute heart failure randomized trial. *Jama* 310:2533-2543
  19. Cleland JG, Teerlink JR, Senior R, Nifontov EM, Mc Murray JJ, Lang CC, Tsyrlin VA, Greenberg BH, Mayet J, Francis DP, Shaburishvili T, Monaghan M, Saltzberg M, Neyses L, Wasserman SM, Lee JH, Saikali KG, Clarke CP, Goldman JH, Wolff AA, Malik FI (2011a) The effects of the cardiac myosin activator, omecamtiv mecarbil, on cardiac function in systolic heart failure: a double-blind, placebo-controlled, crossover, dose-ranging phase 2 trial. *Lancet* 378:676-683
  20. Cleland JGF, Coletta AP, Clark AL (2006) Clinical trials update from the Heart Failure Society of America meeting: FIX-CHF-4, selective cardiac myosin activator and OPT-CHF. *European Journal of Heart Failure* 8:764-766
  21. Cleland JGF, Teerlink JR, Senior R, Nifontov EM, Mc Murray JJV, Lang CC, Tsyrlin VA, Greenberg BH, Mayet J, Francis DP, Shaburishvili T, Monaghan M, Saltzberg M, Neyses L, Wasserman SM, Lee JH, Saikali KG, Clarke CP, Goldman JH, Wolff AA, Malik FI (2011b) The effects of the cardiac myosin activator, omecamtiv mecarbil, on cardiac function in systolic heart failure: a double-blind, placebo-controlled, crossover, dose-ranging phase 2 trial. *The Lancet* 378:676-683
  22. Comín-Colet J, Manito N, Segovia-Cubero J, Delgado J, García Pinilla JM, Almenar L, Crespo-Leiro MG, Sionis A, Blasco T, Pascual-Figal D, Gonzalez-Vilchez F, Lambert-Rodríguez JL, Grau M, Bruguera J (2018) Efficacy and safety of intermittent intravenous outpatient administration of levosimendan in patients with advanced heart failure: the LION-HEART multicentre randomised trial. *European Journal of Heart Failure* 20:1128-1136
  23. Dai DF, Chen T, Szeto H, Nieves-Cintrón M, Kutyavin V, Santana LF, Rabinovitch PS (2011) Mitochondrial targeted antioxidant Peptide ameliorates hypertensive cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 58:73-82
  24. Dai DF, Hsieh EJ, Chen T, Menendez LG, Basisty NB, Tsai L, Beyer RP, Crispin DA, Shulman NJ, Szeto HH, Tian R, MacCoss MJ, Rabinovitch PS (2013) Global proteomics and pathway analysis of pressure-overload-induced heart failure and its attenuation by mitochondrial-targeted peptides. *Circ Heart Fail* 6:1067-1076
  25. De Luca L, Proietti P, Celotto A, Bucciarelli-Ducci C, Benedetti G, Di Roma A, Sardella G, Genuini I, Fedele F (2005) Levosimendan improves hemodynamics and coronary flow reserve after percutaneous coronary intervention in patients with acute myocardial infarction and left ventricular dysfunction. *American Heart Journal* 150:563-568
  26. Delaney A, Bradford C, McCaffrey J, Bagshaw SM, Lee R (2010) Levosimendan for the treatment of acute severe heart failure: A meta-analysis of randomised controlled trials. *International Journal of Cardiology* 138:281-289
  27. Delle Karth G, Buberl A, Geppert A, Neunteufl T, Huelsmann M, Kopp C, Nikfardjam M, Berger R, Heinz G (2003) Hemodynamic effects of a continuous

- infusion of levosimendan in critically ill patients with cardiogenic shock requiring catecholamines. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* 47:1251-1256
28. Edes I, Kiss E, Kitada Y, Powers FM, Papp JG, Kranias EG, Solaro RJ (1995) Effects of Levosimendan, a cardiotoxic agent targeted to troponin C, on cardiac function and on phosphorylation and Ca<sup>2+</sup> sensitivity of cardiac myofibrils and sarcoplasmic reticulum in guinea pig heart. *Circ Res* 77(1):107-13.
  29. Endoh M (1995) The effects of various drugs on the myocardial inotropic response. *General Pharmacology: The Vascular System* 26:1-31
  30. Endoh M (1998) Changes in intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization and Ca<sup>2+</sup> sensitization as mechanisms of action of physiological interventions and inotropic agents in intact myocardial cells. *Jpn Heart Journal* 39(1):1-44
  31. Endoh M (2001) Mechanism of Action of Ca<sup>2+</sup> Sensitizers-Update 2001. *Cardiovascular Drugs & Therapy* 15(5):397-403, September 2001
  32. Erdmann E (2011) Klinische Kardiologie- Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße.
  33. Eriksson HI, Jalonen JR, Heikkinen LO, Kivikko M, Laine M, Leino KA, Kuitunen AH, Kuttilla KT, Peräkylä TK, Sarapohja T, Suojaranta-Ylinen RT, Valtonen M, Salmenperä MT (2009) Levosimendan Facilitates Weaning From Cardiopulmonary Bypass in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Grafting With Impaired Left Ventricular Function. *The Annals of Thoracic Surgery* 87:448-454
  34. ESC Scientific Document Group EG, McDonagh TA, Metra M, Adamo M, Gardner RS, Baumbach A, Böhm M, Burri H, Butler J, Čelutkienė J, Chioncel O, Cleland JGF, Coats AJS, Crespo-Leiro MG, Farmakis D, Gilard M, Heymans S, Hoes AW, Jaarsma T, Jankowska EA, Lainscak M, Lam CSP, Lyon AR, McMurray JJV, Mebazaa A, Mindham R, Muneretto C, Francesco Piepoli M, Price S, Rosano GMC, Ruschitzka F, Kathrine Skibelund A (2021) 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: Developed by the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) With the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *European Heart Journal* 42:3599-3726
  35. Felker GM, Solomon SD, Claggett B, Diaz R, McMurray JJV, Metra M, Anand I, Crespo-Leiro MG, Dahlström U, Goncalvesova E, Howlett JG, MacDonald P, Parkhomenko A, Tomcsányi J, Abbasi SA, Heitner SB, Hucko T, Kupfer S, Malik FI, Teerlink JR (2021) Assessment of Omecamtiv Mecarbil for the Treatment of Patients With Severe Heart Failure: A Post Hoc Analysis of Data From the GALACTIC-HF Randomized Clinical Trial. *JAMA Cardiol*
  36. Flashman E, Redwood C, Moolman-Smook J, Watkins H (2004) Cardiac Myosin Binding Protein C. *Circulation Research* 94:1279-1289
  37. Follath F, Cleland JGF, Just H, Papp JGY, Scholz H, Peuhkurinen K, Harjola VP, Mitrovic V, Abdalla M, Sandell EP, Lehtonen L (2002) Efficacy and safety of intravenous levosimendan compared with dobutamine in severe low-output heart failure (the LIDO study): a randomised double-blind trial. *The Lancet* 360:196-202
  38. Fragasso G, Perseghin G, De Cobelli F, Esposito A, Palloshi A, Lattuada G, Scifo P, Calori G, Del Maschio A, Margonato A (2006) Effects of metabolic modulation by trimetazidine on left ventricular function and phosphocreatine/adenosine triphosphate ratio in patients with heart failure. *Eur Heart J* 27:942-948
  39. Fragasso G, Piatti MPM, Monti L, Palloshi A, Setola E, Puccetti P, Calori G, Lopaschuk GD, Margonato A (2003) Short- and long-term beneficial effects of trimetazidine in patients with diabetes and ischemic cardiomyopathy. *American Heart Journal* 146:854

40. Francis GS, Bartos JA, Adaya S (2014) Inotropes. *Journal of the American College of Cardiology* 63:2069-2078
41. García-González MJ, Domínguez-Rodríguez A, Ferrer-Hita JJ, Abreu-González P, Muñoz MB (2006) Cardiogenic shock after primary percutaneous coronary intervention: Effects of levosimendan compared with dobutamine on haemodynamics. *European Journal of Heart Failure* 8:723-728
42. García-González MJ, MD AD-R, Ferrer-Hita JJ (2005) Utility of Levosimendan, a New Calcium Sensitizing Agent, in the Treatment of Cardiogenic Shock Due to Myocardial Stunning in Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction: A Series of Cases. *The Journal of Clinical Pharmacology* 45:704-708
43. George CH, Mitchell AN, Preece R, Bannister ML, Yousef Z (2016) Pleiotropic mechanisms of action of perhexiline in heart failure. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 26:1049-1059
44. Gheorghide M, De Luca L, Fonarow GC, Filippatos G, Metra M, Francis GS (2005) Pathophysiologic Targets in the Early Phase of Acute Heart Failure Syndromes. *The American Journal of Cardiology* 96:11-17
45. Giamouzis G, Butler J, Starling RC, Karayannis G, Nastas J, Parisi C, Rovithis D, Economou D, Savvatis K, Kirlidis T, Tsaknakis T, Skoularigis J, Westermann D, Tschöpe C, Triposkiadis F (2010) Impact of Dopamine Infusion on Renal Function in Hospitalized Heart Failure Patients: Results of the Dopamine in Acute Decompensated Heart Failure (DAD-HF) Trial. *Journal of Cardiac Failure* 16:922-930
46. Gómez AM, Valdivia HH, Cheng H, Lederer MR, Santana LF, Cannell MB, McCune SA, Altschuld RA, Lederer WJ (1997) Defective Excitation-Contraction Coupling in Experimental Cardiac Hypertrophy and Heart Failure. *Science* 276:800
47. Grossini E, Caimmi PP, Platini F, Molinari C, Uberti F, Cattaneo M, Valente G, Mary DASG, Vacca G, Tessitore L (2010) Modulation of Programmed Forms of Cell Death by Intracoronary Levosimendan During Regional Myocardial Ischemia in Anesthetized Pigs. *Cardiovascular Drugs and Therapy* 24:5-15
48. Haikala H, Kaivola J, Nissinen E, Wall Pi, Levijoki J, Lindén I-B (1995a) Cardiac troponin C as a target protein for a novel calcium sensitizing drug, levosimendan. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 27:1859-1866
49. Haikala H, Nissinen E, Etemadzadeh E, Levijoki J, Lindén I (1995b) Troponin C-mediated calcium sensitization induced by levosimendan does not impair relaxation. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995 May;25(5):794-801
50. Hain J, Onoue H, Mayrleitner M, Fleischer S, Schindler H (1995) Phosphorylation Modulates the Function of the Calcium Release Channel of Sarcoplasmic Reticulum from Cardiac Muscle. *Journal of Biological Chemistry* 270:2074-2081
51. Harjola V-P, Peuhkurinen K, Nieminen MS, Niemelä M, Sundberg S (1999) Oral levosimendan improves cardiac function and hemodynamics in patients with severe congestive heart failure. *American Journal of Cardiology* 83:4-8
52. Harkin C, Pagel P, Tessmer J, Wartier D (1995) Systemic and coronary hemodynamic actions and left ventricular functional effects of levosimendan in conscious dogs. *J Cardiovasc Pharmacol* Aug;26(2):179-88.
53. Hasenfuss G, Burkert Pieske, Maria Castell, Bodo Kretschmann, Lars S. Maier, Just H (1998) Influence of the Novel Inotropic Agent Levosimendan on Isometric Tension and Calcium Cycling in Failing Human Myocardium. *Circulation* 1998;98:2141-2147
54. Hasenfuss G, Holubarsch C, Hermann H, Astheimer K, Pieske B, Just H (1994a) Influence of the force-frequency relationship on haemodynamics and left ventricular function in patients with non-failing hearts and in patients with dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 1994 Feb 15(2):164-70.

55. Hasenfuss G, Mulieri LA, Leavitt BJ, Alpert NR (1994b) Influence of Isoproterenol on Contractile Protein Function, Excitation-Contraction Coupling, and Energy Turnover of Isolated Nonfailing Human Myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 26:1461-1469
56. Hasenfuss G, Teerlink JR (2011) Cardiac inotropes: current agents and future directions. *European Heart Journal* 32:1838-1845
57. Herold GuM (2018) *Innere Medizin : eine vorlesungsorientierte Darstellung : 2018 : unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung : mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis / Gerd Herold und Mitarbeiter.* 2018
58. Ikonomidis I, Parissis JT, Paraskevaidis I, Kourea K, Bistola V, Lekakis J, Filippatos G, Kremastinos DT (2007) Effects of levosimendan on coronary artery flow and cardiac performance in patients with advanced heart failure. *European Journal of Heart Failure* 9:1172-1177
59. Jewitt D, Mitchell A, Birkhead J, Dollery C (1974) CLINICAL CARDIOVASCULAR PHARMACOLOGY OF DOBUTAMINE A SELECTIVE INOTROPIC CATECHOLAMINE. *The Lancet* 304:363-367
60. Kaheinen P, Pollesello P, Levijoki J, Haikala H (2001) Levosimendan Increases Diastolic Coronary Flow in Isolated Guinea-Pig Heart by Opening ATP-Sensitive Potassium Channels. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 37(4):367-374
61. Katano Y, Endoh M (1992) Effects of a cardiotoxic quinolinone derivative Y-20487 on the isoproterenol-induced positive inotropic action and cyclic AMP accumulation in rat ventricular myocardium: comparison with rolipram, Ro 20-1724, milrinone, and isobutylmethylxanthine. *J Cardiovasc Pharmacol* 20(5):715-22
62. Kersten JR, Montgomery MW, Pagel PS, Wartier DC (2000) Levosimendan, a New Positive Inotropic Drug, Decreases Myocardial Infarct Size via Activation of KATP Channels. *Anesthesia & Analgesia* 90:5-11
63. Kivikko M, Antila S, Eha J, Lehtonen L, Pentikäinen P (2002) Pharmacokinetics of levosimendan and its metabolites during and after a 24-hour continuous infusion in patients with severe heart failure. *Int J Clin Pharmacol Ther* Oct;40(10):465-71.
64. Kohlhaas M, Maack C (2010) Adverse bioenergetic consequences of Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger-mediated Ca<sup>2+</sup> influx in cardiac myocytes. *Circulation* 122:2273-2280
65. Kohlhaas M, Nickel AG, Bergem S, Casadei B, Laufs U, Maack C (2017) Endogenous nitric oxide formation in cardiac myocytes does not control respiration during  $\beta$  - adrenergic stimulation. *The Journal of Physiology* 595:3781-3798
66. Kopustinskiene DM, Pollesello P, Saris N-EL (2004) Potassium-specific effects of levosimendan on heart mitochondria. *Biochemical Pharmacology* 68:807-812
67. Labriola C, Siro-Brigiani M, Carrata F, Santangelo E, B. A (2004) Hemodynamic effects of levosimendan in patients with low-output heart failure after cardiac surgery. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2004 Apr;42(4):204-11
68. Lancaster MK, Cook SJ (1997) The effects of levosimendan on [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in guinea-pig isolated ventricular myocytes. *European Journal of Pharmacology* 339:97-100
69. Landoni G, Biondi-Zoccai G, Greco M, Greco T, Bignami E, Morelli A, Guarracino F, Zangrillo A (2012) Effects of levosimendan on mortality and hospitalization. A meta-analysis of randomized controlled studies\*. *Critical Care Medicine* 40:634-646
70. Landoni G, Lomivorotov VV, Alvaro G, Lobreglio R, Pisano A, Guarracino F, Calabrò MG, Grigoryev EV, Likhvantsev VV, Salgado-Filho MF, Bianchi A,

- Pasyuga VV, Baiocchi M, Pappalardo F, Monaco F, Boboshko VA, Abubakirov MN, Amantea B, Lembo R, Brazzi L, Verniero L, Bertini P, Scandroglio AM, Bove T, Belletti A, Michienzi MG, Shukevich DL, Zabelina TS, Bellomo R, Zangrillo A (2017) Levosimendan for Hemodynamic Support after Cardiac Surgery. *New England Journal of Medicine* 376:2021-2031
71. Landoni G, Mizzi A, Biondi-Zoccai G, Bignami E, Prati P, Ajello V, Marino G, Guarracino F, Zangrillo A (2010a) Levosimendan reduces mortality in critically ill patients. A meta-analysis of randomized controlled studies. *Minerva Anestesiologica* 2010 April; 76(4):276-86
  72. Landoni G, Mizzi A, Biondi-Zoccai G, Bruno G, Bignami E, Corno L, Zambon M, Gerli C, Zangrillo A (2010b) Reducing Mortality in Cardiac Surgery With Levosimendan: A Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia* 24:51-57
  73. Lee L, Campbell R, Scheuermann-Freestone M, Taylor R, Gunaruwan P, Williams L, Ashrafian H, Horowitz J, Fraser AG, Clarke K, Frenneaux M (2005) Metabolic Modulation With Perhexiline in Chronic Heart Failure. *Circulation* 112:3280-3288
  74. Leonardo De Luca, Wilson S, Colucci, Markku S, Nieminen, Barry M, Massie, Gheorghide M (2006) Evidence-based use of levosimendan in different clinical settings. *European Heart Journal* Volume 27:Pages 1908–1920
  75. Léopold V, Gayat E, Pirracchio R, Spinar J, Parenica J, Tarvasmäki T, Lassus J, Harjola V-P, Champion S, Zannad F, Valente S, Urban P, Chua H-R, Bellomo R, Popovic B, Ouweneel DM, Henriques JPS, Simonis G, Lévy B, Kimmoun A, Gaudard P, Basir MB, Markota A, Adler C, Reuter H, Mebazaa A, Chouihed T (2018) Epinephrine and short-term survival in cardiogenic shock: an individual data meta-analysis of 2583 patients. *Intensive Care Medicine* 44:847-856
  76. Leppikangas H, Tenhunen JJ, Lindgren L, Salenius JP, Ruokonen E (2008) Effects of levosimendan on indocyanine green plasma disappearance rate and the gastric mucosal–arterial pCO<sub>2</sub> gradient in abdominal aortic aneurysm surgery. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* 52:785-792
  77. Levy B, Clere-Jehl R, Legras A, Morichau-Beauchant T, Leone M, Frederique G, Quenot J-P, Kimmoun A, Cariou A, Lassus J, Harjola V-P, Meziani F, Louis G, Rossignol P, Duarte K, Girerd N, Mebazaa A, Vignon P, Mattei M, Thivilier C, Perez P, Auchet T, Fritz C, Boisrame-Helme J, Mercier E, Garot D, Perny J, Gette S, Hammad E, Vigne C, Dargent A, Andreu P, Guiot P (2018) Epinephrine Versus Norepinephrine for Cardiogenic Shock After Acute Myocardial Infarction. *Journal of the American College of Cardiology* 72:173-182
  78. Lilleberg, Jyrki and S Nieminen, M and Akkila, J and Heikkilä La, Kuitunen Aa, Lehtonen, Liisa and Verkkala Ka, Mattila Sa, Salmenperä M (1998) Effects of a new calcium sensitizer, levosimendan, on hemodynamics, coronary blood flow and myocardial substrate utilization early after coronary artery bypass grafting. *European heart journal* 19
  79. Lilleberg J, Ylönen V, Lehtonen L, Toivonen L (2004) The calcium sensitizer levosimendan and cardiac arrhythmias: an analysis of the safety database of heart failure treatment studies. *Scandinavian Cardiovascular Journal* 38:80-84
  80. Louhelainen M, Vahtola E, Kaheinen P, Leskinen H, Merasto S, Kytö V, Finckenberg P, Colucci WS, Levijoki J, Pollesello P, Haikala H, Mervaala EMA (2007) Effects of levosimendan on cardiac remodeling and cardiomyocyte apoptosis in hypertensive Dahl/Rapp rats. *British Journal of Pharmacology* 150:851-861
  81. Maack C, Eschenhagen T, Hamdani N, Heinzl FR, Lyon AR, Manstein DJ, Metzger J, Papp Z, Tocchetti CG, Yilmaz MB, Anker SD, Balligand J-L, Bauersachs J, Brutsaert D, Carrier L, Chlopicki S, Cleland JG, de Boer RA,

- Dietl A, Fischmeister R, Harjola V-P, Heymans S, Hilfiker-Kleiner D, Holzmeister J, de Keulenaer G, Limongelli G, Linke WA, Lund LH, Masip J, Metra M, Mueller C, Pieske B, Ponikowski P, Ristić A, Ruschitzka F, Seferović PM, Skouri H, Zimmermann WH, Mebazaa A (2019) Treatments targeting inotropy: A position paper of the Committees on Translational Research and Acute Heart Failure of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *European Heart Journal* 40:3626-3644
82. Maack C, Kohlhaas M, Nickel AG (2017) Mitochondrial energetics and calcium coupling in the heart. *The Journal of Physiology* 595:3753-3763
83. Maack C, Nickel A, Kohlhaas M (2014) Mitochondrial reactive oxygen species production and elimination. *J Mol Cell Cardiol* 73:26-33
84. Maack C, O'Rourke B (2007) Excitation-contraction coupling and mitochondrial energetics. *Basic research in cardiology* 102:369-392
85. Maack C, Thomas Eschenhagen, Nazha Hamdani, Frank R. Heinzel, Alexander R. Lyon, Dietmar J. Manstein, Joseph Metzger, Zoltán Papp, Carlo G. Tocchetti, M. Birhan Yilmaz, Stefan D. Anker, Jean-Luc Balligand, Johann Bauersachs, Dirk Brutsaert, Lucie Carrier, Stefan Chlopicki, John G. Cleland, Rudolf A. de Boer, Rodolphe Fischmeister V-PH, Stephane Heymans, , Denise Hilfiker-Kleiner JH, Gilles de Keulenaer, Giuseppe Limongelli, Wolfgang A. Linke, , Josep Masip, Marco Metra, Christian Mueller, Burkert Pieske, Piotr Ponikowski, Arsen Ristić, Frank Ruschitzka, Petar M. Seferović, Hadi Skouri, Wolfram H. Zimmermann AM (2018) Treatments targeting Inotropy. *European Heart Journal*
86. Machaj F, Dembowska E, Rosik J, Szostak B, Mazurek-Mochol M, Pawlik A (2019) New therapies for the treatment of heart failure: a summary of recent accomplishments. *Ther Clin Risk Manag* 15:147-155
87. Maharaj R, Metaxa V (2011) Levosimendan and mortality after coronary revascularisation: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Crit Care* 15:R140
88. Malik FI, Hartman JJ, Elias KA, Morgan BP, Rodriguez H, Brejc K, Anderson RL, Sueoka SH, Lee KH, Finer JT, Sakowicz R, Baliga R, Cox DR, Garard M, Godinez G, Kawas R, Kraynack E, Lenzi D, Lu PP, Muci A, Niu C, Qian X, Pierce DW, Pokrovskii M, Suehiro I, Sylvester S, Tochimoto T, Valdez C, Wang W, Katori T, Kass DA, Shen YT, Vatner SF, Morgans DJ (2011) Cardiac Myosin Activation: A Potential Therapeutic Approach for Systolic Heart Failure. *Science* 331:1439-1443
89. Maytin M, Colucci WS (2005) Cardioprotection: A New Paradigm in the Management of Acute Heart Failure Syndromes. *The American Journal of Cardiology* 96:26-31
90. McMurray JJV (2010) Systolic Heart Failure. *New England Journal of Medicine* 362:228-238
91. Mebazaa A, Nieminen M, Packer M, Cohen-Solal A, Kleber F, SJ P, Thakkar R, Padley R, Pöder P, Kivikko M, Investigators. S (2007) Levosimendan vs dobutamine for patients with acute decompensated heart failure: the SURVIVE Randomized Trial. *JAMA* 297(17):1883-91.
92. Mebazaa A, Nieminen MS, Filippatos GS, Cleland JG, Salon JE, Thakkar R, Padley RJ, Huang B, Cohen-Solal A (2009) Levosimendan vs. dobutamine: outcomes for acute heart failure patients on  $\beta$ -blockers in SURVIVE. *Eur J Heart Fail* 11:304-311
93. Mehta RH, Leimberger JD, van Diepen S, Meza J, Wang A, Jankowich R, Harrison RW, Hay D, Fremes S, Duncan A, Soltesz EG, Lubner J, Park S, Argenziano M, Murphy E, Marcel R, Kalavrouziotis D, Nagpal D, Bozinovski J, Toller W, Heringlake M, Goodman SG, Levy JH, Harrington RA, Anstrom KJ, Alexander JH (2017) Levosimendan in Patients with Left Ventricular

- Dysfunction Undergoing Cardiac Surgery. *New England Journal of Medicine* 376:2032-2042
94. Meijs M, F.L., Asselbergs FW, Doevendans PA (2012) Omecamtiv mecarbil: a promising new drug in systolic heart failure. *European Journal of Heart Failure* 14:232-233
  95. Melenovsky V, Petrak J, Mracek T, Benes J, Borlaug BA, Nuskova H, Pluhacek T, Spatenka J, Kovalcikova J, Drahota Z, Kautzner J, Pirk J, Houstek J (2017) Myocardial iron content and mitochondrial function in human heart failure: a direct tissue analysis. *European Journal of Heart Failure* 19:522-530
  96. Metra M, Teerlink JR (2017) Heart failure. *The Lancet* 390:1981-1995
  97. Michels G, Khan IF, Endres-Becker J, Rottlaender D, Herzig S, Ruhparwar A, Wahlers T, Hoppe UC (2009) Regulation of the Human Cardiac Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> Uptake by 2 Different Voltage-Gated Ca<sup>2+</sup> Channels. *Circulation* 119:2435-2443
  98. Moiseyev V, Poder P, Andrejevs N, Ruda M, Golikov A, Lazebnik L, Kobalava Z, Lehtonen L, Laine T, Nieminen M, Lie K (2002) Safety and efficacy of a novel calcium sensitizer, levosimendan, in patients with left ventricular failure due to an acute myocardial infarction. A randomized, placebo-controlled, double-blind study (RUSSLAN). *Eur heart J* 23:1422–1432
  99. Molenaar P, Christ T, Hussain RI, Engel A, Berk E, Gillette KT, Chen L, Galindo-Tovar A, Krobert KA, Ravens U, Levy FO, Kaumann AJ (2013) PDE3, but not PDE4, reduces  $\beta_1$  - and  $\beta_2$ -adrenoceptor-mediated inotropic and lusitropic effects in failing ventricle from metoprolol-treated patients. *Br J Pharmacol* 169:528-538
  100. Molina CE, Leroy J, Richter W, Xie M, Scheitrum C, Lee I-O, Maack C, Rucker-Martin C, Donzeau-Gouge P, Verde I, Llach A, Hove-Madsen L, Conti M, Vandecasteele G, Fischmeister R (2012) Cyclic Adenosine Monophosphate Phosphodiesterase Type 4 Protects Against Atrial Arrhythmias. *Journal of the American College of Cardiology* 59:2182-2190
  101. Morgan BP, Muci A, Lu PP, Qian X, Tochimoto T, Smith WW, Garard M, Kraynack E, Collibee S, Suehiro I, Tomasi A, Valdez SC, Wang W, Jiang H, Hartman J, Rodriguez HM, Kawas R, Sylvester S, Elias KA, Godinez G, Lee K, Anderson R, Sueoka S, Xu D, Wang Z, Djordjevic N, Malik FI, Morgans DJ (2010) Discovery of Omecamtiv Mecarbil the First, Selective, Small Molecule Activator of Cardiac Myosin. *ACS Med Chem Lett* 1:472-477
  102. Mulieri L, Hasenfuss G, Leavitt B, Allen P, Alpert N (1992) Altered myocardial force-frequency relation in human heart failure. *Circulation* 1992 May 85(5):1743-50
  103. Nagy L, Kovacs A, Bodi B, Pasztor ET, Fulop GA, Toth A, Edes I, Papp Z (2015) The novel cardiac myosin activator omecamtiv mecarbil increases the calcium sensitivity of force production in isolated cardiomyocytes and skeletal muscle fibres of the rat. *Br J Pharmacol* 172:4506-4518
  104. Nagy L, Pollesello P, Papp Z (2014) Inotropes and Inodilators for Acute Heart Failure: Sarcomere Active Drugs in Focus. *J Cardiovasc Pharmacol* 64:199-208
  105. Narula J, Haider N, Virmani R, DiSalvo TG, Kolodgie FD, Hajjar RJ, Schmidt U, Semigran MJ, Dec GW, Khaw B-A (1996) Apoptosis in Myocytes in End-Stage Heart Failure. *New England Journal of Medicine* 335:1182-1189
  106. Neumann T, Biermann J, Neumann A, Wasem J, Ertl G, Dietz R, Erbel R (2009) Herzinsuffizienz. *Dtsch Arztebl International* 106:269-275
  107. Nickel Alexander G, von Hardenberg A, Hohl M, Löffler Joachim R, Kohlhaas M, Becker J, Reil J-C, Kazakov A, Bonnekoh J, Stadelmaier M, Puhl S-L, Wagner M, Bogeski I, Cortassa S, Kappl R, Pasiaka B, Lafontaine M, Lancaster CRoy D, Blacker Thomas S, Hall Andrew R, Duchon Michael R, Kästner L, Lipp P, Zeller T, Müller C, Knopp A, Laufs U, Böhm M, Hoth M, Maack C (2015)

- Reversal of Mitochondrial Transhydrogenase Causes Oxidative Stress in Heart Failure. *Cell Metabolism* 22:472-484
108. NVL Versorgungsleitlinien, Bundesärztekammer (BÄK) KBK, Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) (2017) Nationale VersorgungsLeitlinie Chronische Herzinsuffizienz – Langfassung, 2. Auflage. 2. Auflage
  109. Ørstavik Ø, Ata SH, Riise J, Dahl CP, Andersen G, Levy FO, Skomedal T, Osnes J, Qvigstad E (2014) Inhibition of phosphodiesterase-3 by levosimendan is sufficient to account for its inotropic effect in failing human heart. *Br J Pharmacol* 171:5169-5181
  110. Ørstavik Ø, Manfra O, Andressen KW, Andersen GØ, Skomedal T, Osnes J-B, Levy FO, Krobert KA (2015) The Inotropic Effect of the Active Metabolite of Levosimendan, OR-1896, Is Mediated through Inhibition of PDE3 in Rat Ventricular Myocardium. *PLoS ONE* 10:e0115547
  111. Ørstavik Ø (2015) Ca<sup>2+</sup>-Sensitization, PDE inhibition and myosin activation: A scrutiny of the cardiac effects of levosimendan and omecamtiv mecarbil.
  112. Ovidiu C, Alexandre M, Veli-Pekka H, J. CA, Francesco PM, G. CLM, Cecile L, M. SP, D. AS, Roberto F, Frank R, Silvia LF, Daniela M, Gerasimos F, P. MA (2017) Clinical phenotypes and outcome of patients hospitalized for acute heart failure: the ESC Heart Failure Long-Term Registry. *European Journal of Heart Failure* 19:1242-1254
  113. Packer M, Colucci W, Fisher L, Massie BM, Teerlink JR, Young J, Padley RJ, Thakkar R, Delgado-Herrera L, Salon J, Garratt C, Huang B, Sarapohja T (2013) Effect of Levosimendan on the Short-Term Clinical Course of Patients With Acutely Decompensated Heart Failure. *JACC: Heart Failure* 1:103-111
  114. Pagel PS, Hettrick DA, Wartier DC (1996) Influence of levosimendan, pimobendan, and milrinone on the regional distribution of cardiac output in anaesthetized dogs. *British Journal of Pharmacology* 119:609-615
  115. Paolucci N, Katori T, Champion HC, St John ME, Miranda KM, Fukuto JM, Wink DA, Kass DA (2003) Positive inotropic and lusitropic effects of HNO/NO- in failing hearts: independence from beta-adrenergic signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:5537-5542
  116. Paolucci N, Saavedra WF, Miranda KM, Martignani C, Isoda T, Hare JM, Espey MG, Fukuto JM, Feelisch M, Wink DA, Kass DA (2001) Nitroxyl anion exerts redox-sensitive positive cardiac inotropy in vivo by calcitonin gene-related peptide signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10463-10468
  117. Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S, Bondke Persson A, Brenner B, Burckhardt G, Draguhn A, Ehmke H, Eysel U, Fandrey J, Geiger J, Gekle M, Göbel K, Gödecke A, Kelm M, Korbmacher C, Kraft T, Krämer U, Kämmerer U, Kühl M, Luhmann HJ, Mairböurl H, Meuth SG, Meßlinger K, Münte T, Oberleithner H, Paschke R, Persson PB, Rieger L, Schrader J, Singer D, Walzog B (2014). *Physiologie* (Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag)
  118. Papp Z, Édes I, Fruhwald S, De Hert SG, Salmenperä M, Leppikangas H, Mebazaa A, Landoni G, Grossini E, Caimmi P, Morelli A, Guarracino F, Schwinger RHG, Meyer S, Algotsson L, Wikström BG, Jörgensen K, Filippatos G, Parissis JT, González MJG, Parkhomenko A, Yilmaz MB, Kivikko M, Pollesello P, Follath F (2012) Levosimendan: Molecular mechanisms and clinical implications: Consensus of experts on the mechanisms of action of levosimendan. *International Journal of Cardiology* 159:82-87
  119. Parissis JT, Panou F, Farmakis D, Adamopoulos S, Filippatos G, Paraskevaidis I, Venetsanou K, Lekakis J, Kremastinos DT (2005) Effects of Levosimendan on Markers of Left Ventricular Diastolic Function and Neurohormonal Activation in Patients With Advanced Heart Failure. *The American Journal of Cardiology* 96:423-426

120. Pataricza J, HÖHN J, PETRI A, BALOGH Á, PAPP JG (2000) Comparison of the Vasorelaxing Effect of Cromakalim and the New Inodilator, Levosimendan, in Human Isolated Portal Vein. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 52:213-217
121. Planelles-Herrero VJ, Hartman JJ, Robert-Paganin J, Malik FI, Houdusse A (2017) Mechanistic and structural basis for activation of cardiac myosin force production by omecamtiv mecarbil. *Nat Commun* 8:190
122. Pöder P, Eha J, Sundberg S, Antila S, Heinpalu M, Loogna I, Planken Ü, Rantanen S, Lehtonen L (2004) Pharmacodynamics and Pharmacokinetics of Oral Levosimendan and Its Metabolites in Patients With Severe Congestive Heart Failure: A Dosing Interval Study. *The Journal of Clinical Pharmacology* 44:1143-1150
123. Pollesello P, Ovaska M, Kaivola J, Tilgmann C, Lundström K, Kalkkinen N, Ulmanen I, Nissinen E, Taskinen J (1994) Binding of a new Ca<sup>2+</sup> sensitizer, levosimendan, to recombinant human cardiac troponin C. A molecular modelling, fluorescence probe, and proton nuclear magnetic resonance study. *J Biol Chem* 18;269(46):28584-90.
124. Pollesello P, Papp Z, Papp JG (2016) Calcium sensitizers: What have we learned over the last 25years? *International Journal of Cardiology* 203:543-548
125. Prem S, Schwinger PDmRHG (2015) Levosimendan bei Patienten mit akuter Herzinsuffizienz.
126. Puttonen J, Kantele S, Ruck A, Ramela M, Häkkinen S, Kivikko M, Pentikäinen PJ (2008) Pharmacokinetics of Intravenous Levosimendan and Its Metabolites in Subjects With Hepatic Impairment. *The Journal of Clinical Pharmacology* 48:445-454
127. Raasmaja A, Talo A, Haikala H, Nissinen E, Lindén I, Pohto P (1997) Biochemical properties of OR-1259--a positive inotropic and vasodilatory compound with an antiarrhythmic effect. *Adv Exp Med Biol* 1992 311:423
128. Raasmaja A, Talo A, Nissinen E, Lindén I-B, Pohto P (1991) Biochemical mechanisms of the novel cardiotoxic agent OR-1259. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 23:S129
129. Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R (2016). *Biochemie*, Rassow J, K Hauser, R Netzker, R Deutzmann, eds. (Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag)
130. Reeves ML, Leigh BK, England PJ (1987) The identification of a new cyclic nucleotide phosphodiesterase activity in human and guinea-pig cardiac ventricle. Implications for the mechanism of action of selective phosphodiesterase inhibitors. *Biochem J* 241:535-541
131. Robertson IM, Sun YB, Li MX, Sykes BD (2010) A structural and functional perspective into the mechanism of Ca<sup>2+</sup>-sensitizers that target the cardiac troponin complex. *J Mol Cell Cardiol* 49:1031-1041
132. Ruffolo RR (1987) Review: The Pharmacology of Dobutamine. *The American Journal of the Medical Sciences* 294:244-248
133. Rydström J (2006) Mitochondrial NADPH, transhydrogenase and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1757:721-726
134. Sabbah HN, Gupta RC, Kohli S, Wang M, Hachem S, Zhang K (2016) Chronic Therapy With Elamipretide (MTP-131), a Novel Mitochondria-Targeting Peptide, Improves Left Ventricular and Mitochondrial Function in Dogs With Advanced Heart Failure. *Circ Heart Fail* 9:e002206
135. Sabbah HN, Tocchetti CG, Wang M, Daya S, Gupta RC, Tunin RS, Mazhari R, Takimoto E, Paolucci N, Cowart D, Colucci WS, Kass DA (2013) Nitroxyl (HNO): A novel approach for the acute treatment of heart failure. *Circ Heart Fail* 6:1250-1258

136. Samimi-Fard S, García-González MJ, Domínguez-Rodríguez A, Abreu-González P (2008) Effects of levosimendan versus dobutamine on long-term survival of patients with cardiogenic shock after primary coronary angioplasty. *International Journal of Cardiology* 127:284-287
137. Sandell EP, Hayha M, Antila S, Heikkinen P, Ottoila P, Lehtonen LA, PJ P (1995) Pharmacokinetics of levosimendan in healthy volunteers and patients with congestive heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995;26 Suppl 1:S57-62
138. Schünke M, Schulte E, Schumacher U (2015). *Innere Organe*, Schünke M, E Schulte, U Schumacher, eds. (Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag)
139. Schwarte LA, Picker O, Bornstein SR, Fournell A, Scheeren TWL (2005) Levosimendan is superior to milrinone and dobutamine in selectively increasing microvascular gastric mucosal oxygenation in dogs. *Critical Care Medicine* 33(1):135-142
140. Schwinger RHG, Brixius K (2005) Wenn die Myofilamente sensibel werden. *Dtsch med Wochenschr* 130:969-973
141. Shen YT, Malik FI, Zhao X, Depre C, Dhar SK, Abarzua P, Morgans DJ, Vatner SF (2010) Improvement of cardiac function by a cardiac Myosin activator in conscious dogs with systolic heart failure. *Circ Heart Fail* 3:522-527
142. Singh BN, Lilleberg J, Sandell E-P, Ylönen V, Lehtonen L, Toivonen L (1999) Effects of levosimendan on cardiac arrhythmia: electrophysiologic and ambulatory electrocardiographic findings in phase II and phase III clinical studies in cardiac failure. *American Journal of Cardiology* 83:16-20
143. Smith RAJ, Hartley RC, Cochemé HM, Murphy MP (2012) Mitochondrial pharmacology. *Trends in Pharmacological Sciences* 33:341-352
144. Song L-S, Wang S-Q, Xiao R-P, Spurgeon H, Lakatta EG, Cheng H (2001) [beta]-Adrenergic Stimulation Synchronizes Intracellular Ca<sup>2+</sup> Release During Excitation-Contraction Coupling in Cardiac Myocytes. *Circulation Research: Journal of the American Heart Association* Volume 88(8), pp 794-801
145. Sonntag S, Sundberg S, Lehtonen LA, Kleber FX (2004) The calcium sensitizer levosimendan improves the function of stunned myocardium after percutaneous transluminal coronary angioplasty in acute myocardial ischemia. *Journal of the American College of Cardiology* 43:2177-2182
146. Sorsa T, Heikkinen S, Abbott M, Abusamhadneh E, Laakso T, Tilgmann C, Serimaa R, Annala A, Rosevear P, Drakenberg T, Pollesello P, Kilpeläinen I (2001) Binding of levosimendan, a calcium sensitizer, to cardiac troponin C. *J Biol Chem* 276(12):9337-43.
147. Sorsa T, Pollesello P, Permi P, Drakenberg T, Kilpeläinen I (2003) Interaction of levosimendan with cardiac troponin C in the presence of cardiac troponin I peptides. *J Mol Cell Cardiol* 35(9):1055-61
148. Stapel B, Kohlhaas M, Ricke-Hoch M, Haghikia A, Erschow S, Knuuti J, Silvola JM, Roivainen A, Saraste A, Nickel AG, Saar JA, Sieve I, Pietzsch S, Müller M, Bogeski I, Kappl R, Jauhiainen M, Thackeray JT, Scherr M, Bengel FM, Hagl C, Tudorache I, Bauersachs J, Maack C, Hilfiker-Kleiner D (2017) Low STAT3 expression sensitizes to toxic effects of  $\beta$ -adrenergic receptor stimulation in peripartum cardiomyopathy. *Eur Heart J* 38:349-361
149. Szeto HH (2014) First-in-class cardioprotective compound as a therapeutic agent to restore mitochondrial bioenergetics. *Br J Pharmacol* 171:2029-2050
150. Szilágyi S, Pollesello P, Levijoki J, Kaheinen P, Haikala H, Édes I, Papp Z (2004) The effects of levosimendan and OR-1896 on isolated hearts, myocyte-sized preparations and phosphodiesterase enzymes of the guinea pig. *European Journal of Pharmacology* 486:67-74
151. Tacon CL, McCaffrey J, Delaney A (2012) Dobutamine for patients with severe heart failure: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Intensive Care Medicine* 38:359-367

152. Takahashi R, Talukder M, Endoh M (2000) Inotropic effects of OR-1896, an active metabolite of levosimendan, on canine ventricular myocardium. *Eur J Pharmacol* 14;400(1):103-12
153. Tarvasmäki T, Lassus J, Varpula M, Sionis A, Sund R, Køber L, Spinar J, Parissis J, Banaszewski M, Silva Cardoso J, Carubelli V, Di Somma S, Mebazaa A, Harjola VP (2016) Current real-life use of vasopressors and inotropes in cardiogenic shock - adrenaline use is associated with excess organ injury and mortality. *Crit Care* 20:208
154. Teerlink JR, Clarke CP, Saikali KG, Lee JH, Chen MM, Escandon RD, Elliott L, Bee R, Habibzadeh MR, Goldman JH, Schiller NB, Malik FI, Wolff AA (2011) Dose-dependent augmentation of cardiac systolic function with the selective cardiac myosin activator, omecamtiv mecarbil: a first-in-man study. *The Lancet* 378:667-675
155. Teerlink JR, Diaz R, Felker GM, McMurray JJV, Metra M, Solomon SD, Biering-Sørensen T, Böhm M, Bonderman D, Fang JC, Lanfear DE, Lund M, Momomura SI, O'Meara E, Ponikowski P, Spinar J, Flores-Arredondo JH, Claggett BL, Heitner SB, Kupfer S, Abbasi SA, Malik FI (2021) Effect of Ejection Fraction on Clinical Outcomes in Patients Treated With Omecamtiv Mecarbil in GALACTIC-HF. *J Am Coll Cardiol* 78:97-108
156. Teerlink JR, Diaz R, Felker GM, McMurray JJV, Metra M, Solomon SD, Legg JC, Büchele G, Varin C, Kurtz CE, Malik FI, Honarpour N (2020) Omecamtiv Mecarbil in Chronic Heart Failure With Reduced Ejection Fraction: Rationale and Design of GALACTIC-HF. *JACC Heart Fail* 8:329-340
157. Teerlink JR, Felker GM, McMurray JJV, Ponikowski P, Metra M, Filippatos GS, Ezekowitz JA, Dickstein K, Cleland JGF, Kim JB, Lei L, Knusel B, Wolff AA, Malik FI, Wasserman SM (2016a) Acute Treatment With Omecamtiv Mecarbil to Increase Contractility in Acute Heart Failure: The ATOMIC-AHF Study. *Journal of the American College of Cardiology* 67:1444-1455
158. Teerlink JR, Felker GM, McMurray JJV, Solomon SD, Adams Jr KF, Cleland JGF, Ezekowitz JA, Goudev A, Macdonald P, Metra M, Mitrovic V, Ponikowski P, Serpytis P, Spinar J, Tomcsányi J, Vandekerckhove HJ, Voors AA, Monsalvo ML, Johnston J, Malik FI, Honarpour N (2016b) Chronic Oral Study of Myosin Activation to Increase Contractility in Heart Failure (COSMIC-HF): a phase 2, pharmacokinetic, randomised, placebo-controlled trial. *The Lancet* 388:2895-2903
159. Teerlink JR, Felker GM, McMurray JJV, Solomon SD, Adams KF, Cleland JGF, Ezekowitz JA, Goudev A, Macdonald P, Metra M, Mitrovic V, Ponikowski P, Serpytis P, Spinar J, Tomcsányi J, Vandekerckhove HJ, Voors AA, Monsalvo ML, Johnston J, Malik FI, Honarpour N (2016c) Chronic Oral Study of Myosin Activation to Increase Contractility in Heart Failure (COSMIC-HF): a phase 2, pharmacokinetic, randomised, placebo-controlled trial. *The Lancet* 388:2895-2903
160. Teneggi V, Sivakumar N, Chen D, Matter A (2018) Drugs' development in acute heart failure: what went wrong? *Heart Failure Reviews*
161. Tibbits GF, Hamman BN (1991) Regulation of myocardial contractility. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 23:1140-1144
162. Tocchetti CG, Wang W, Froehlich JP, Huke S, Aon MA, Wilson GM, Di Benedetto G, O'Rourke B, Gao WD, Wink DA, Toscano JP, Zaccolo M, Bers DM, Valdivia HH, Cheng H, Kass DA, Paolucci N (2007) Nitroxyl improves cellular heart function by directly enhancing cardiac sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> cycling. *Circ Res* 100:96-104
163. Triposkiadis FK, Butler J, Karayannis G, Starling RC, Filippatos G, Wolski K, Parissis J, Parisi C, Rovithis D, Koutrakis K, Skoularigis J, Antoniou C-K, Chrysohoou C, Pitsavos C, Stefanadis C, Nastas J, Tsaknakis T, Mantziari L,

- Giannakoulas G, Karvounis H, Kalogeropoulos AP, Giamouzis G (2014) Efficacy and safety of high dose versus low dose furosemide with or without dopamine infusion: The Dopamine in Acute Decompensated Heart Failure II (DAD-HF II) Trial. *International Journal of Cardiology* 172:115-121
164. Tritapepe L, De Santis V, Vitale D, Santulli M, Morelli A, Nofroni I, Puddu PE, Singer M, Pietropaoli P (2006) Preconditioning effects of levosimendan in coronary artery bypass grafting—a pilot study. *British Journal of Anaesthesia* 96:694-700
165. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S (2011) Oxidative stress and heart failure. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 301:H2181-H2190
166. Tuttle R, Mills J (1975) Dobutamine: development of a new catecholamine to selectively increase cardiac contractility. *Circ Res* 36(1):185-96.
167. Ukkonen H, Saraste M, Akkila J, Knuuti J, Karanko M, Iida H, Lehtonen P, Nägren K, Lehtonen L, Voipio-Pulkki LM (2000) Myocardial efficiency during levosimendan infusion in congestive heart failure. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 68:522-531
168. Van Der Velden J, Klein L, Zaremba R, Boontje N, Huybregts M, Stooker W, Eijnsman L, Jong J, Visser C, Visser F, Stienen G (2001) Effects of calcium, inorganic phosphate, and pH on isometric force in single skinned cardiomyocytes from donor and failing human hearts. *Circulation* 2001 Sep 4 104(10):1140-6
169. Vu T, Ma P, Xiao JJ, Wang Y-MC, Malik FI, Chow AT (2015) Population pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of omecamtiv mecarbil, a cardiac myosin activator, in healthy volunteers and patients with stable heart failure. *The Journal of Clinical Pharmacology* 55:1236-1247
170. Weil J, Schunkert H (2006) Pathophysiologie der chronischen Herzinsuffizienz. *Clinical Research in Cardiology* 95:1-17
171. Wencker D, Chandra M, Nguyen K, Miao W, Garantziotis S, Factor SM, Shirani J, Armstrong RC, Kitsis RN (2003) A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure. *J Clin Invest* 111:1497-1504
172. Westfall MV, Turner II, Albayya FP, Metzger JM (2001) Troponin I chimera analysis of the cardiac myofilament tension response to protein kinase A. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 280:C324-C332
173. Winkelmann DA, Forgacs E, Miller MT, Stock AM (2015) Structural basis for drug-induced allosteric changes to human  $\beta$ -cardiac myosin motor activity. *Nat Commun* 6:7974
174. Wolff MR, Buck SH, Stoker SW, Greaser ML, Mentzer RM (1996) Myofibrillar calcium sensitivity of isometric tension is increased in human dilated cardiomyopathies: role of altered beta-adrenergically mediated protein phosphorylation. *J Clin Invest* 98:167-176
175. Yilmaz MB, Yalta K, Yontar C, Karadas F, Erdem A, Turgut OO, Yilmaz A, Tandogan I (2007) Levosimendan Improves Renal Function in Patients with Acute Decompensated Heart Failure: Comparison with Dobutamine. *Cardiovascular Drugs and Therapy* 21:431-435
176. Yokoshiki H, Katsube Y, Sunagawa MS, Nicholas (1997) The Novel Calcium Sensitizer Levosimendan Activates the ATP-Sensitive K<sup>+</sup> Channel in Rat Ventricular Cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 283 (1) 375-383
177. Yue DT, Herzig S, Marban E (1990) Beta-adrenergic stimulation of calcium channels occurs by potentiation of high-activity gating modes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:753-757

178. Zemljic G, Bunc M, Yazdanbakhsh AP, Vrtovec B (2007) Levosimendan Improves Renal Function in Patients With Advanced Chronic Heart Failure Awaiting Cardiac Transplantation. *Journal of Cardiac Failure* 13:417-421
179. Zimmermann N, Boknik P, Gams E, Herzig J, Neumann J, Scholz H (1998) Calcium sensitization as new principle of inotropic therapy in end-stage heart failure? *Eur J Cardiothorac Surg* 14(1):70-5
180. Zobel C, Reuter H, Schwinger RHG (2004) Einsatz des Ca<sup>2+</sup>-Sensitizers Levosimendan zur Behandlung eines Patienten im kardiogenen Schock. *Medizinische Klinik* 99:742-746

## 7 Publikationen

- Deutsche Gesellschaft für Kardiologie, 51. Jahrestagung 2016, Mannheim  
- Vortrag -
- International Heart Failure Congress 2016, Florenz, Italien  
- Posterpräsentation -
- Deutsche Gesellschaft für Kardiologie, Herztage 2016, Berlin  
- Posterpräsentation -

Abstract: Bioenergetic properties of levosimendan and omecamtiv mecarbil in guinea-pig cardiac myocytes.

## 8 Danksagungen

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Christoph Maack und Herrn Dr. rer. nat. Michael Kohlhaas für die wissenschaftliche Unterstützung, die konstruktiven Diskussionen, Ratschläge und Anmerkungen über die gesamte Bearbeitungsphase. Dies umfasst auch die wissenschaftlichen Präsentationen im Rahmen von (inter-)nationalen Tagungen, Journal Clubs, Schulungen und den Erkenntnisgewinn, den ich durch diese Veranstaltungen für meine berufliche Entwicklung erlangt habe.

Außerdem möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe, insbesondere Michelle Gulentz, meinen Dank für die unentwegte methodische Begleitung aussprechen.

Besonders möchte ich an dieser Stelle auch meiner gesamten Familie, vor allem meiner Mutter, meinem Vater, Birgit und Wolfgang für die unermüdliche Stärkung,

Dissertation Daniela Pütz

Motivation und das stets offene Ohr danken. Auch danke ich meinem Bruder Tom für seine Art Dinge ins rechte Licht zu rücken und meinem Großvater.

Zuletzt gilt mein Dank meinen Freunden und meinem Partner.

## **9 Lebenslauf**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

## **10 Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberaterinnen/ Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die in Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Die Bedeutung der eidesstattlichen Erklärung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen Erklärung sind mir bekannt.

Aachen, den .....

---

Daniela Pütz