

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie an der Martin-Luther-Universität Halle-  
Wittenberg

(Direktor: Prof. Dr. med. J. Neumann)



**ZEITLICHE UND VENTRIKELSPECIFISCHE VERÄNDERUNGEN  
KARDIOVASKULÄRER PARAMETER IM SYMPATHOADRENERGEN SYSTEM  
IM MONOCROTALIN-RATTEN-MODELL DER  
RECHTSHERZHYPERTROPHIE UND -INSUFFIZIENZ**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Katja Brandt

geboren am 22. Mai 1979 in Karlsburg

Gutachter:

PD Dr. K. Leineweber

Prof. Dr. J. Holtz

Datum der Verteidigung: 28.09.2007

**urn:nbn:de:gbv:3-000012385**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000012385>]

## Referat und bibliographische Beschreibung

Am Modell der Monocrotalin (MCT)-induzierten Rechtsherzhypertrophie (RHH)/-insuffizienz (RHI) erfolgte in Ratten die Untersuchung von zeitlichen und ventrikelspezifischen Veränderungen kardiovaskulärer Parameter des sympathoadrenergen Systems. Die Experimente umfassten dabei die Bestimmung der Noradrenalin-Konzentration im Blutplasma (pNA) als indirektes Maß einer Erhöhung der Sympathikusaktivität, die Bestimmung der neuronalen Noradrenalin-Transporter (NAT)-Dichte und -Aktivität, der  $\beta$ -Adrenozeptoren ( $\beta$ -AR)-Dichte und -Subtypenverteilung sowie die Bestimmung der G-Protein-gekoppelten Rezeptor Kinase (GRK)-Aktivität isoliert im rechten und linken Ventrikel innerhalb von drei Zeitintervallen (I: 7-10 Tage, II: 13-19 Tage und III: 21-28 Tage nach MCT-Applikation) im Vergleich zu altersentsprechenden Kontrolltieren (KO). Ergänzend erfolgte die Messung der Noradrenalin (NA)-induzierten Kontraktion der Arteria pulmonalis und der Aorta thoracica.

Innerhalb des ersten Zeitintervalls zeigten sich keine Anzeichen einer rechtsventrikulären Hypertrophie und bis auf eine signifikante Abnahme der rechtsventrikulären  $\beta$ -AR-Dichte (KO:  $27,7 \pm 2,9$  vs. MCT:  $18,9 \pm 2,4$  fmol/mg Protein,  $p < 0,001$ ), (die wahrscheinlich auf die akut toxischen Effekte des MCT zurückzuführen ist) keine Veränderungen der oben genannten Parameter. Im Zeitintervall II, 13-19 Tage nach MCT-Gabe, kam es zur Ausbildung einer Rechtsherzhypertrophie (RV-Gewicht KO:  $147,2 \pm 5,3$  vs. MCT:  $222,5 \pm 6,6$  mg und RV/LV-Gewicht KO:  $0,29 \pm 0,01$  vs. MCT:  $0,42 \pm 0,01$ ;  $p < 0,001$ ), jedoch ohne signifikante Veränderungen der oben genannten Parameter, bis auf eine signifikante Verschiebung im  $\beta_1$ : $\beta_2$  AR-Verhältnis zu Gunsten der  $\beta_2$ -AR (KO:  $73 \pm 1$ : $27 \pm 1$  vs. MCT:  $55 \pm 3$ : $45 \pm 3\%$ ;  $p < 0,001$ ) sowie eine Abnahme der maximalen NA-induzierten Kontraktion ( $E_{max}$ ) der Arteria pulmonalis (KO:  $15,9 \pm 1,5$  vs. MCT:  $5,8 \pm 0,7$  mN/mm<sup>2</sup>;  $p < 0,001$ ). Im dritten Zeitintervall (III) lag dagegen eine ausgeprägte rechtsventrikuläre Hypertrophie vor (RV-Gewicht KO:  $148,3 \pm 2,3$  vs. MCT:  $316,4 \pm 4,2$  mg und RV/LV-Gewicht KO:  $0,3 \pm 0,0$  vs. MCT:  $0,61 \pm 0,01$ ;  $p < 0,001$ ), die jetzt verbunden war mit deutlichen Veränderungen der oben genannten Parameter: erhöhte pNA-Spiegel (KO:  $278 \pm 18$  vs. MCT:  $645 \pm 63$  pg/ml;  $p < 0,001$ ), eine Zunahme der rechtsventrikulären Membran-assoziierten GRK-Aktivität (KO:  $67 \pm 6$  vs. MCT:  $100 \pm 1,5$  [<sup>32</sup>P]-Rhodopsin in cpm;  $p < 0,05$ ), eine Abnahme der NAT-Dichte (KO:  $79,6 \pm 2,9$  vs. MCT:  $51,0 \pm 11,3$  fmol/mg Protein;  $p < 0,05$ ) und -Aktivität (KO:  $111,8 \pm 15,9$  vs. MCT:  $65,4 \pm 7,4$  pmol [<sup>3</sup>H]-NA/mg Gewebe/15 min;  $p < 0,05$ ) und eine bedeutende Reduktion der  $\beta$ -AR-Dichte (KO:  $26,5 \pm 1,1$  vs. MCT:  $13,4 \pm 1,3$  fmol/mg Protein;  $p < 0,001$ ) verbunden mit einer Verschiebung im  $\beta_1$ : $\beta_2$  AR-Verhältnis (KO:  $75 \pm 1$ : $25 \pm 1$  vs. MCT:  $54 \pm 3$ : $46 \pm 3\%$ ;  $p < 0,001$ ). Zusätzlich zeigte sich eine signifikante Verminderung der maximalen NA-induzierten Kontraktion ( $E_{max}$ ) der MCT-Tiere sowohl bei der Aorta thoracica (KO:  $8,6 \pm 0,7$  vs. MCT:  $5,8 \pm 0,5$  mN/mm<sup>2</sup>;  $p < 0,01$ ), als auch bei der Arteria pulmonalis (KO:  $14,1 \pm 1,1$  vs. MCT:  $5,9 \pm 0,5$  mN/mm<sup>2</sup>;  $p < 0,001$ ).

Im linken Ventrikel der MCT-Tiere konnten, in allen drei Zeitintervallen, keine signifikanten Veränderungen in den oben genannten Parameter im Vergleich zu den Kontrollratten festgestellt werden. Demzufolge eignet sich dieses Modell sehr gut zum Studium einer spezifisch rechtsventrikulären Hypertrophie bzw. Insuffizienz auf dem Boden einer pulmonalen Hypertonie, so wie es bei Patienten mit *Cor pulmonale* gesehen wird.

Brandt, Katja: Zeitliche und ventrikelspezifische Veränderungen kardiovaskulärer Parameter im sympathoadrenergen System im Monocrotalin-Ratten-Modell der Rechtsherzhypertrophie und -insuffizienz. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 81 Seiten, 2007

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	I
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	III
<b>1. Einleitung</b>	1
1.1. Herzinsuffizienz: Definition, Einteilung, Pathomechanismen	1
1.2. Vom <i>Cor pulmonale</i> zur Rechtsherzinsuffizienz	5
1.3. Tiermodell der Monocrotalin-induzierten Rechtsherzhypertrophie und -insuffizienz	9
1.4. Ziel der Arbeit	10
<b>2. Versuchstiere und Methoden</b>	12
2.1. Versuchstiere und Haltungsbedingungen	12
2.2. Bestimmung der Plasma-Noradrenalin-Konzentration	13
2.2.1. Blutentnahme/Plasmagewinnung	13
2.2.2. Ermittlung der Plasma-Noradrenalin-Konzentration mit Hilfe der HPLC	14
2.3. Radioligandbindungsstudien an $\beta$ -adrenergen Rezeptoren	15
2.3.1. Rezeptortheorie/Grundlagen zur Durchführung von Bindungsstudien	15
2.3.2. Herstellung/Präparation der Rohmembranfraktion	17
2.3.3. Sättigungsanalysen zur Bestimmung der $\beta$ -Adrenozeptor-Dichte	17
2.3.4. Kompetitionsanalysen zur Subtypisierung von $\beta$ -Adrenozeptoren	18
2.3.5. Auswertung der Radioligandbindungsstudien	19
2.4. Bestimmung der G-Protein-gekoppelten Rezeptor Kinase-Aktivität	22
2.4.1. Aufbereitung der ventrikulären Zytosol- und Membranfraktion	23
2.4.2. Lichtabhängige Rhodopsin-in-vitro-Phosphorylierung	23
2.5. Untersuchungen am kardialen Noradrenalin-Transporter	24
2.5.1. Präparation der Rohmembranfraktion	24
2.5.2. Bestimmung der Noradrenalin-Transporter-Dichte	25
2.5.3. Bestimmung der Noradrenalin-Transporter-Aktivität	26
2.5.4. Auswertungen zum Noradrenalin-Transporter	27
2.6. Kontraktionsmessungen an der Arteria pulmonalis und Aorta thoracica	27
2.6.1. Gefäßpräparation	27
2.6.2. Kontraktionsmessungen	28
2.7. Statistische Auswertung	29
2.8. Verwendete Lösungen und Puffer	30
2.9. Herstellernachweis der verwendeten Substanzen	33
2.10. Verwendete Geräte und Einmalartikel	35
<b>3. Ergebnisse</b>	37
3.1. Charakterisierung des Tiermodells	37
3.1.1. Futteraufnahme, Körper- und Organgewichte	37

3.1.2. Plasma-Noradrenalin-Konzentration	41
3.2. Bindungseigenschaften kardialer $\beta$ -Adrenozeptoren	41
3.3. Bestimmung der GRK-Aktivität im ventrikulären Gewebe	44
3.4. Untersuchungen zum Noradrenalin-Transporter	47
3.4.1. Messung der Noradrenalin-Transporter-Dichte	47
3.4.2. Bestimmung der Noradrenalin-Transporter-Aktivität	48
3.5. Noradrenalin-induzierte Kontraktion der Arteria pulmonalis und Aorta thoracica	50
<b>4. Diskussion</b>	<b>52</b>
4.1. Monocrotalin-Tiermodell	52
4.2. Kardiale $\beta$ -Adrenozeptoren	54
4.3. Noradrenalin-Transporter	58
4.4. Kontraktionsmessungen der Arteria pulmonalis und Aorta thoracica	60
4.5. Weiterführende Gedanken	63
<b>5. Zusammenfassung der Ergebnisse</b>	<b>64</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>66</b>
<b>7. Thesen</b>	<b>81</b>
<b>Anhang</b>	
Lebenslauf	
Selbständigkeitserklärung	
Erklärung über frühere Promotionsversuche	
Publikation	
Danksagung	

AC	Adenylyl-Cyclase
ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
ANP	atriales natriuretisches Peptid
ATP	Adenosintriphosphat
$\beta_{(1,2)}$ -AR	$\beta_{(1,2)}$ -Adrenozeptor(en)
$B_{max}$	Rezeptorendichte
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
cpm	counts per minute
DMI	Desipramin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptor Kinase
GTP	Guanosintriphosphat
HPLC	High-Pressure-Liquid-Chromatography
ICYP	-(-)[ <sup>125</sup> J]-Jodocyanopindolol
i.p.	intraperitoneal
IP	Inositolphosphat
IU	International units
$K_D$	Dissoziationskonstante
KG	Körpergewicht
LV	linker Ventrikel
LVEDP	linksventrikulärer enddiastolischer Druck
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LVSG	linker Ventrikel + Septum Gewicht
M	Molar (g/l)
MAO	Monoaminoxidase
MCT	Monocrotalin
mks	modified-Krebs-Henseleit-solution
n	Anzahl der Wiederholungen = Tiere
NA	Noradrenalin
NAT	Noradrenalin-Transporter

n.s.	nicht signifikant
pNA	Plasma-Noradrenalin
PPH	primäre pulmonale Hypertonie
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RHH	Rechtsherzhypertrophie
RHI	Rechtsherzinsuffizienz
RV	rechter Ventrikel
RVG	rechtsventrikuläres Gewicht
s.c.	subcutan
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
TCA	Trichloressigsäure
vs.	versus

# 1. Einleitung

## 1.1. Herzinsuffizienz: Definition, Einteilung, Pathomechanismen

Die Bezeichnung Herzinsuffizienz dient der Beschreibung eines klinischen Syndroms. Man versteht darunter einen pathophysiologischen Zustand, der dadurch gekennzeichnet ist, dass das Herz in seiner Eigenschaft als Pumporgan nicht mehr den Anforderungen in der Peripherie gewachsen ist (DIETZ, 1992). Dies bedeutet die Unfähigkeit des Herzens sauerstoff- und nährstoffreiches Blut in Abhängigkeit von den Bedürfnissen der Peripherie zu transportieren bzw., dass das Herz diesen Anforderungen nur bei unphysiologisch hohen Füllungsdrücken nachkommen kann (BRAUNWALD, 1991; BÖHM, 2000). Klinisch bedeutet Herzinsuffizienz, dass dem Symptomenkomplex der Luftnot und schnellen Ermüdbarkeit eine kardiale Erkrankung als Ursache zu Grunde liegt (WHO, 1995).

Die Ursachen einer Herzinsuffizienz sind sehr vielfältig. Zu ihnen zählen vorrangig die koronare Herzkrankheit (KHK), die arterielle Hypertonie sowie Kardiomyopathien (BÖHM, 2000). Die Kardiomyopathien werden klinisch unterteilt in dilatative, restriktive, hypertroph-obstruktive und arrhythmogen-rechtsventrikuläre Kardiomyopathien (RICHARDSON et al., 1996).

Die Klassifikation der Herzinsuffizienz richtet sich nach der vorwiegend betroffenen Herzkammer, wobei für jeden Ventrikel wiederum ein Vorwärts- von einem Rückwärtsversagen differenziert wird (Abbildung 1). Sind beide Herzkammern von der Insuffizienz betroffen, liegt eine Globalinsuffizienz vor.

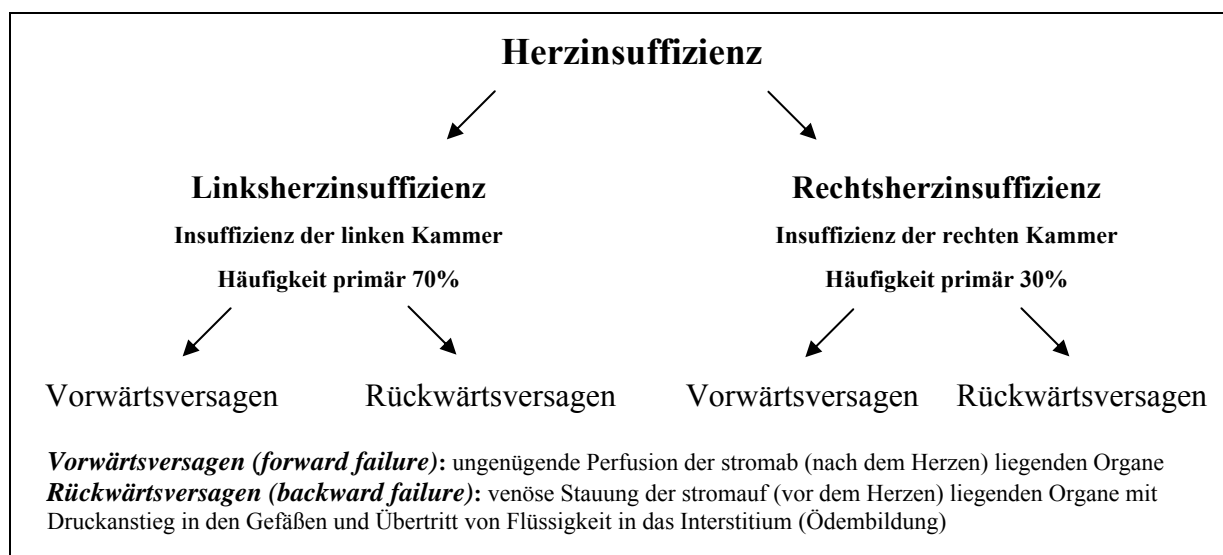


Abbildung 1: Einteilung der Herzinsuffizienz; modifiziert nach DIETZ (1992).

Des Weiteren kann man nach den Phasen der Herzaktion zwischen einer systolischen und einer diastolischen Insuffizienz unterscheiden. Eine systolische Insuffizienz (Häufigkeit 80%) liegt vor, wenn die Ursache des Pumpversagens in einer Kontraktionsschwäche des Myokards zu suchen ist, wohingegen eine diastolische Insuffizienz (Häufigkeit 20%) einem Pumpversagen aufgrund einer behinderten Kammerfüllung entspricht (Relaxations- oder Compliancestörung). Obwohl die diastolische Herzinsuffizienz als ein eigenständiges Krankheitsbild angesehen wird, liegt bei den meisten herzinsuffizienten Patienten eine Kombination aus einer Kontraktions- und einer Relaxationsstörung des Herzens vor (BÖHM, 2000). Darüber hinaus lässt sich eine Herzinsuffizienz in einen „low output failure“ und einen „high output failure“ differenzieren. Besteht eine kardiale Insuffizienzsymptomatik aufgrund einer reduzierten Förderleistung spricht man von einem „low output failure“. Liegt jedoch eine solche Symptomatik trotz normaler oder sogar erhöhter Förderleistung vor, handelt es sich um ein „high output failure“ (BRAUNWALD, 1992; HELLIGE et al., 1994).

Bereits bei einer Herzinsuffizienz im Frühstadium kommt es kompensatorisch zu einer Aktivierung des sympathischen Nervensystems. Diese ist indirekt gekennzeichnet durch eine Erhöhung der Plasma-Noradrenalin (pNA)-Spiegel (THOMAS et al., 1978; LEVINE et al., 1982). Schon unter Ruhebedingungen ist die pNA-Konzentration bei Patienten mit Herzinsuffizienz im Vergleich zu gesunden Probanden um das zwei- bis dreifache erhöht (BÖHM, 2000). In verschiedenen Studien an herzinsuffizienten Patienten konnte gezeigt werden, dass diese Erhöhung mit relevanten hämodynamischen Parametern korreliert (LEVINE et al., 1982; COHN et al., 1984). Mit Vorranschreiten der Erkrankung verschlechtert sich die linksventrikuläre Pumpfunktion. Dies spiegelt sich wider in einer Erhöhung des pulmonalkapillären Drucks und einer Verminderung des Herzindex ( $l/min/m^2$ ). Es wurde beobachtet, dass eine Zunahme der NA-Spiegel im direkten Zusammenhang mit einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität bei Patienten mit Herzinsuffizienz steht (COHN et al., 1984, 1989). Somit stellt die Bestimmung der pNA-Konzentration einen wichtigen prognostischen Marker bei diesen Patienten dar (COHN et al., 1984; RECTOR et al., 1987).

Die systemisch vorliegenden pNA-Spiegel stellen jedoch nicht eins zu eins die NA-Konzentrations-Verhältnisse im synaptischen Spalt dar. Diese Konzentrationen werden durch mehrere Faktoren bestimmt. Zum einen durch den Umfang des freigesetzten NA aus den sympathischen Nervenendigungen und zum anderen durch das Ausmaß der neuronalen Wiederaufnahme (Uptake<sub>1</sub>) sowie der extraneuronalen Inaktivierung, dem Uptake<sub>2</sub> (HASKINGS et al., 1986). Der Anstieg der pNA-Konzentration bei Herzinsuffizienz kann somit einerseits auf eine vermehrte NA-Freisetzung und andererseits auf eine abnehmende Wiederaufnahme in noradrenerge Nervenendigungen, als Folge einer Reduktion der neuronalen Noradrenalin-Transporter (NAT)-Dichte und -Aktivität, zurückgeführt werden (LIANG et al., 1989; BÖHM et al., 1995, 1998; UNGERER et al., 1996a; LEINWEBER et al., 2000, 2002a).



Ein über einen längeren Zeitraum bestehender erhöhter NA-Spiegel führt zu charakteristischen Veränderungen innerhalb des kardiovaskulären Adrenorezeptor-Systems. (Abbildung 2). Diese umfassen eine selektive Downregulation der myokardialen  $\beta_1$ -Adrenorezeptoren ( $\beta_1$ -AR), eine Desensibilisierung der  $\beta_2$ -Adrenorezeptoren ( $\beta_2$ -AR, BRISTOW et al., 1982, 1984, 1986, 1992; BRODDE et al., 1991, 1992, 1995, 2001; DELEHANTY et al., 1994), einen Anstieg der G-Protein-gekoppelten Rezeptor Kinase (GRK)-Aktivität (FAN et al., 1987; BRISTOW et al., 1989; LAI et al., 1996; SEYFARTH et al., 2000) verbunden mit einer Abnahme der stimulierenden G-Proteine ( $G_s$ ) bzw. eine Zunahme der inhibierenden  $G_i$ -alpha Proteine und eine Abnahme der Adenylyl-Cyclase (AC)-Aktivität (NEUMANN et al., 1988; BÖHM et al., 1990; BRODDE et al., 1995; LAI et al., 1996).

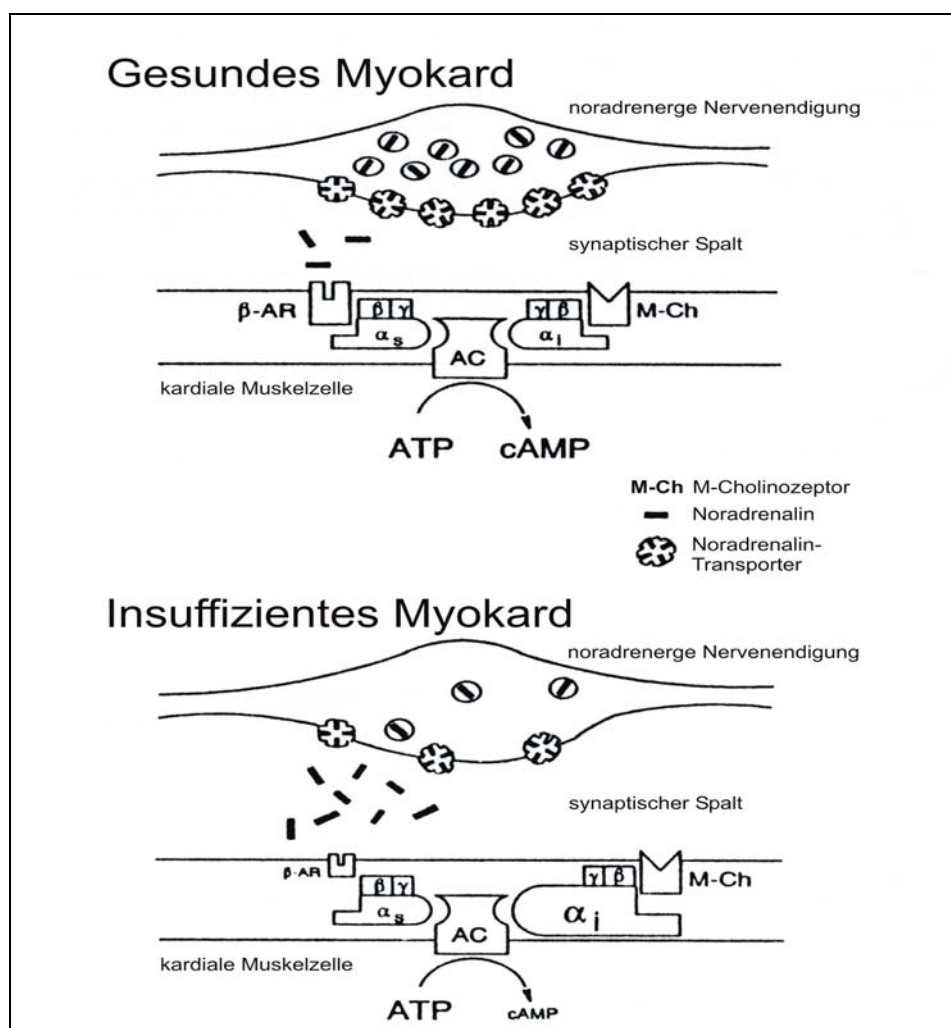


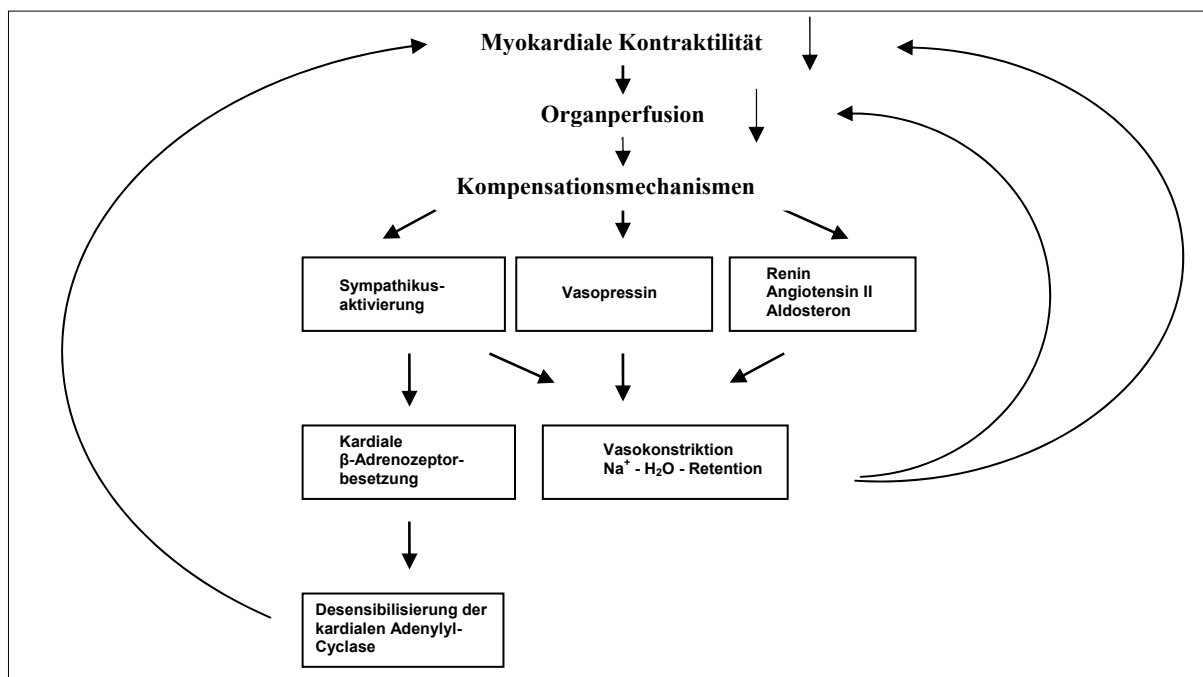
Abbildung 2: Veränderungen im sympathoadrenergen System bei Herzinsuffizienz; modifiziert nach BÖHM et al. (1995).

Eine anhaltende sympathoadrenerge Stimulation führt über die genannten Veränderungen, vorrangig durch Zunahme der GRK-Aktivität, zu einer Entkoppelung der  $\beta$ -AR vom

G-Protein-AC-System. Diese Veränderungen führen wiederum zu einer deutlich verminderten Stimulierbarkeit des insuffizienten Myokards, sowohl durch endogene als auch durch exogene Katecholamine (BRISTOW et al., 1982, 1989; FAN et al., 1987; BRODDE 1991; BÖHM et al., 2000).

Daneben treten Modifikationen innerhalb des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) als weitere Anpassungsmechanismen des Herzens auf, um die benötigte Sauerstoffzufuhr zu gewährleisten (ERDMANN, 1995; BÖHM, 2000; BRAUNWALD et al., 2001). Das RAAS ist funktionell eng an das sympathische Nervensystem gekoppelt, sodass es zu synergistischen Wirkungen beider Systeme kommt. Haupteffekte sind die frühzeitige Aktivierung organspezifischer Renin-Angiotensin-Systeme, die Induktion einer myokardialen Zellhypertrophie und Kollagenbildung sowie eine NaCl- und Wasserretention über die Niere (BÖHM, 2000).

Die Kompensationsmechanismen des Herzens halten zwar die benötigte Sauerstoffzufuhr des Körpers über einen gewissen Zeitraum aufrecht, führen jedoch im Sinne eines *Circulus vitiosus* zu einer Verschlechterung der kardialen Funktion bis hin zum absoluten Pumpversagen (CORTI et al., 2000; FLORAS, 2002; Abbildung 3).



**Abbildung 3: Nervenale und humorale Kompensationsmechanismen und deren Folgen bei Herzinsuffizienz; modifiziert nach ERDMANN (1995).**

Ein weiterer Kompensationsmechanismus zur Steigerung der verminderten Auswurfleistung stellt die myokardiale Hypertrophie dar (GROSSMANN et al., 1974; GERDES et al., 1992), die durch einen Zuwachs an kontraktilen Proteinen zu einer Steigerung der myokardialen

Kontraktionskraft führt (SPANN et al., 1967; ERDMANN, 1995). Dieser Kompensationsversuch des insuffizienten Herzens bleibt jedoch, wie die Kompensationsmechanismen des sympathoadrenergen Systems und/oder des RAAS nur für einen gewissen Zeitraum effektiv, da er langfristig im Sinne einer Maladaptation in eine dekompensierte Hypertrophie übergeht und schließlich in einer kontraktile Dysfunktion des hypertrophierten Myokards gipfelt (KATZ, 1990).

## 1.2. Vom *Cor pulmonale* zur Rechtsherzinsuffizienz

Da die Mehrheit der bisher durchgeführten klinischen und tierexperimentellen Studien die Ursachen, Pathomechanismen und Therapiemöglichkeiten der wesentlich häufigeren Linksherzinsuffizienz fokussiert, bestehen zum Themengebiet der Rechtsherzinsuffizienz (RHI), insbesondere des *Cor pulmonale* noch viele offene Fragen. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den pathophysiologischen Veränderungen in der RHI, welche sich auf dem Boden eines *Cor pulmonale* entwickeln.

Das *Cor pulmonale* ist laut Definition der WHO (1963) eine Hypertrophie des rechten Ventrikels als Folge einer pulmonal-arteriellen Hypertonie, die durch Krankheiten entstanden ist, welche aus einer funktionellen oder strukturellen Einschränkung des Lungenparenchyms, der Bronchien und der Lungengefäße resultiert. Nicht zum Krankheitsbild des *Cor pulmonale* werden Rechtsherzhypertrophien gezählt, die durch Lungen- und Gefäßveränderungen aufgrund primärer Erkrankungen des linken Ventrikels oder durch angeborene Herzfehler mit Rezirkulation entstanden sind (GRIEBENOW & HAUCH, 1992).

Eine manifeste pulmonale Hypertonie liegt bei einem pulmonal-arteriellen Mitteldruck in Ruhe  $>20$  mmHg vor, wobei bei schwersten Formen der Mitteldruck über 55 mmHg ansteigen kann. Die Hypertrophie verursachenden pulmonalen Hypertonien werden klinisch in die seltenere primäre pulmonale Hypertonie (PPH) und die sekundäre pulmonale Hypertonie gegliedert. Die PPH ist gekennzeichnet durch einen Anstieg des pulmonal-arteriellen Blutdruckes und des pulmonalen Gefäßwiderstandes mit unklarer Ätiologie und Dyspnoe als vorherrschendes Symptom (BEUCKELMANN, 1997). Der Begriff sekundäre pulmonale Hypertonie wird verwendet wenn eine Erhöhung des pulmonal-arteriellen Drucks und eine Zunahme des Strömungswiderstandes aufgrund einer verifizierbaren Erkrankung der Lunge vorliegen. Zu diesen zählen mit über 80% der Fälle vorrangig die chronisch-obstruktiven Lungenerkrankungen (COPD's) wie das Asthma bronchiale, das Lungenemphysem und die chronisch-spastische Bronchitis. Von Bedeutung sind ebenfalls parenchymatöse Lungenerkrankungen, die zur Bildung von Lungenfibrosen führen wie die zystische Fibrose, Silikosen und Pneumonien, rezidivierende Lungenembolien und entzündliche bzw. immunologische Lungenprozesse (Kollagenosen, Sarkoidose). Außerdem sollten Erkrankungen, welche die Beweglichkeit des Thorax einschränken und so zu einer

Behinderung der Atemwege führen (alveoläre Hypoxie), wie schwere Kyphoskoliosen, Pleuraverschwartungen und chronisch neuromuskuläre Erkrankungen, wie Myastenia gravis und Poliomyelitis, erwähnt werden (BEHRENBECK, 1984; GRIEBENOW & HAUCH, 1992).

Bestehen diese Lungenerkrankungen über einen längeren Zeitraum, kommt es durch die sich einstellende pulmonal-arterielle Hypoxie über den Euler-Liljestrand-Mechanismus kompensatorisch zu einer pulmonalen Vasokonstriktion, die zu der beschriebenen pulmonalen Hypertonie (Druck- und Widerstandserhöhung im kleinen Kreislauf) führt. Durch die daraus resultierende chronische Druck- und Volumenbelastung (erhöhte Nachlast des rechten Herzens) kommt es zur Ausbildung eines *Cor pulmonale*. Je nach zu Grunde liegendem pulmonalem Krankheitsbild beeinflussen inflammatorische Prozesse und eine mechanische Obliteration diese Entwicklung durch eine weitere Zunahme der Vasokonstriktion und eine Verlegung der Pulmonalgefäße zusätzlich ungünstig. Es resultieren strukturelle Veränderungen in den pulmonalen Gefäßwänden (Remodeling), in Form einer Proliferation der glatten Gefäßmuskulatur und der Fibroblasten (WAHNRATH et al., 1998; BRAUNWALD & BRISTOW 2000).

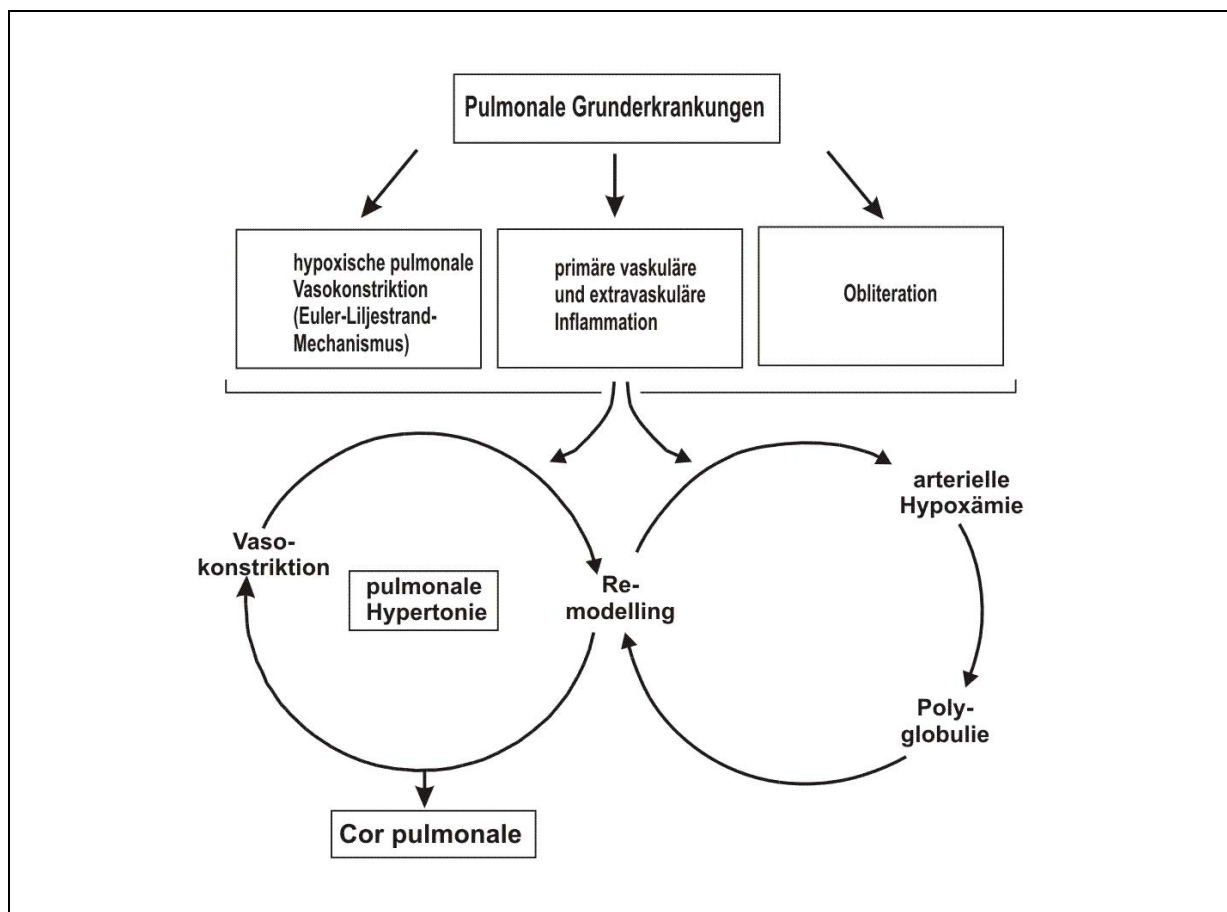


Abbildung 4: Entstehung eines *Cor pulmonale*; modifiziert nach WAHNRATH et al. (1998).

Abzugrenzen vom chronischen *Cor pulmonale*, als Folge chronischer Lungen- und Lungengefäßerkrankungen, ist das akute *Cor pulmonale*. Bei diesem Krankheitsbild handelt es sich um eine Dilatation des rechten Ventrikels infolge einer akuten Druckbelastung wie sie z.B. bei einer fulminanten Lungenembolie oder im Status asthmaticus zu finden ist (GRIEBENOW & HAUCH, 1992; KONSTANTINIDES & HASENFUSS, 2004).

Morphologisch äußert sich die Entwicklung eines *Cor pulmonale* in einer Vermehrung der rechtsventrikulären Muskelmasse (Rechtsherzhypertrophie) und einer Zunahme der Längs- und Querachse der rechten Herzkammer mit daraus resultierender Links- und Querverlagerung des gesamten Herzens. Nach REINDELL et al. (1964) werden drei Stadien des *Cor pulmonale* unterschieden, wobei im Stadium III eine manifeste Herzinsuffizienz vorliegt (Tabelle 1).

Stadium	Herzgröße	Diastolischer Füllungsdruck	Suffizienzgrad
I	nicht vergrößert	nicht erhöht	kompensiert (konzentrische Hypertrophie)
II	noch normal	Ruhe: normal oder erhöht Belastung: erhöht	beginnende Rechtsherzinsuffizienz
III	vergrößert	Ruhe: normal oder erhöht Belastung: erhöht	manifeste Rechtsherzinsuffizienz

**Tabelle 1: Stadieneinteilung des *Cor pulmonale* nach REINDELL et al. (1964).**

Es ist schwierig detaillierte Aussagen über die Häufigkeit des chronischen *Cor pulmonale* zu treffen, da ein Vergleich der veröffentlichten Ergebnisse eine erhebliche Streuung aufweist (WOOD, 1956; MATTHES, 1961; REINDELL et al., 1964; HAMMER, 1971; LASCH & NOLTE, 1971; VOGT & RUTTNER, 1977; WANG et al., 1997; ORTH et al., 1999; KONSTANTINIDES & HASENFUSS, 2004). Gründe hierfür sind im rekrutierten Patientengut und den unterschiedlichen Einordnungsschemata der Patienten zu suchen. Im pathologisch anatomischen Autopsiematerial schwankt die Häufigkeit des *Cor pulmonale* zwischen 0,7 und 2,3% (LASCH & NOLTE, 1971). Bei den klinisch behandelten Herzpatienten liegt der Anteil des chronischen *Cor pulmonale* bei 5%, wobei dieses Krankheitsbild für 5-15% der durch Herzkrankheiten bedingten Todesfälle und für 2-6% der Gesamtmortalität verantwortlich ist (WOOD, 1956.). Nach REINDELL et al. (1964) und ORTH et al. (1999) macht das *Cor pulmonale* 4-10% aller Herzkrankheiten aus, wobei der Anteil des *Cor pulmonale* aller stationär mit Herzinsuffizienz behandelten Patienten zwischen 10-30% nach ORTH et al. (1999) variiert. Bei Betrachtung der Geschlechterverteilung liegt der Anteil der männlichen Patienten mit chronischen *Cor pulmonale* wesentlich über dem der Frauen (GRIEBENOW & HAUCH, 1992). Nach LASCH & NOLTE (1971) ist das *Cor pulmonale* bei Männern 3- bis

10 mal häufiger als bei Frauen. Bei einer durch HERBERG et al. (1964) durchgeführten Untersuchung waren unter 6870 Patienten mit chronischem *Cor pulmonale* 71% männlichen Geschlechts. Die Ursache hierfür ist nicht zuletzt in der Geschlechterverteilung der pulmonalen Grunderkrankungen zu suchen. Der Altersgipfel der Manifestation des *Cor pulmonale* liegt im 6. und 7. Dezenium (BEHRENBECK, 1984; WANG et al., 1997).

Im Vordergrund der Behandlung eines *Cor pulmonale* steht die Therapie der Grundkrankheit. Bei den chronisch-obstruktiven Lungenerkrankungen kommen vor allem Bronchodilatoren und die Langzeitgabe von Sauerstoff zum Einsatz (NOCTURAL OXYGEN THERAPY TRIAL, 1980; BRITISH MEDICAL RESEARCH COUNCIL DOMICILARY STUDY, 1981; GRINER, 2000). Entzündliche Erkrankungen der Lunge verlangen eine antiinflammatorische bzw. immunsuppressive Therapie z.B. mit Korticosteroiden. Beim Auftreten von rezidivierenden Embolien als Auslöser eines *Cor pulmonale* ist eine Therapie mit Antikoagulantien unumgänglich.

Die zweite Säule der Therapie eines chronischen *Cor pulmonale* hat zum Ziel die Symptomatik dieses Krankheitsbildes, durch eine Senkung des erhöhten Drucks im Lungenkreislauf und eine Behandlung der kardialen Dekompensation, zu verbessern. Zu diesem Zweck kommen Diuretika, verschiedene Vasodilatoren (ACE-Hemmer, Nitrate, ANP, Hydrazalin), Digitalisglycoside und Calciumantagonisten zum Einsatz (BLUMENSTEN, 1986; THE CONSENSUS TRIAL STUDY GROUP, 1987; URETSKY et al., 1993; SCHWINGER, 1995; CARGILL et al., 1996; MAHAJAN et al., 1996; TASK FORCE REPORT, 2001). Die Standardtherapie umfasst meist die Gabe von einem Digitalisglycosid zur Steigerung der myokardialen Kontraktilität in Kombination mit einem Diuretikum und einem ACE-Inhibitor zur Senkung der Vor- und Nachlast (ERDMANN, 1995). In wieweit zusätzliche Medikamente wie Betablocker, Angiotensin-Rezeptorenblocker, dopaminerge Substanzen, Antiarrhythmika, Aldosteron-Rezeptor-Antagonisten, Endothelin-Rezeptor-Antagonisten und Immunsuppressiva bei der Therapie der chronischen Herzinsuffizienz zum Einsatz kommen ist noch nicht hinreichend geklärt und Gegenstand vieler laufender bzw. kürzlich veröffentlichter Studien (PITT et al., 1999, 2000; COHN et al., 2001; Packer et al., 2001; TASK FORCE REPORT, 2001; THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY, 2003).

Bei einer Herzinsuffizienz im Endstadium ist die Herz- bzw. die kombinierte Herz-Lungentransplantation als eine lebensverlängernde Maßnahme für den Patienten zu erwägen. Studienergebnisse zeigen, dass die Mehrzahl der Patienten nach diesem Eingriff einen erheblichen Zugewinn an Lebensqualität vorweisen und die Mehrheit sogar wieder in der Lage ist teil- oder sogar vollzeitig ihrer alten Beschäftigung nachzugehen (PARIS et al., 1993; HOSENPUUD et al., 1999). Lebenslimitierend nach einer Transplantation sind hauptsächlich die Folgen der immunsuppressiven Therapie wie Infektionen, Niereninsuffizienz, Hypertension und die Bildung maligner Tumore (TASK FORCE REPORT, 2001).

### 1.3. Tiermodell der Monocrotalin-induzierten Rechtsherzhypertrophie und -insuffizienz

Ein etabliertes Modell zum Studium der Effekte einer pulmonalen Hypertonie ist das Monocrotalin (MCT)-Rattenmodell (KAY et al., 1967). Vergleichende experimentelle Studien haben gezeigt, dass eine einmalige Injektion des Pyrrolizidin-Alkaloides MCT (Abbildung 5) bei Ratten innerhalb von 14 Tagen eine schwere pulmonale Hypertonie hervorruft, die über die kompensatorische Entwicklung einer Rechtsherzhypertrophie (RHH), mit Aktivierung des sympathoadrenergen Systems, langfristig in eine RHI mündet (KAY et al., 1967; CECONI et al., 1989; WERCHAN et al., 1989; BROWN et al., 1998; DOGRELL & BROWN, 1998; MURDERS & ELSNER, 2000).

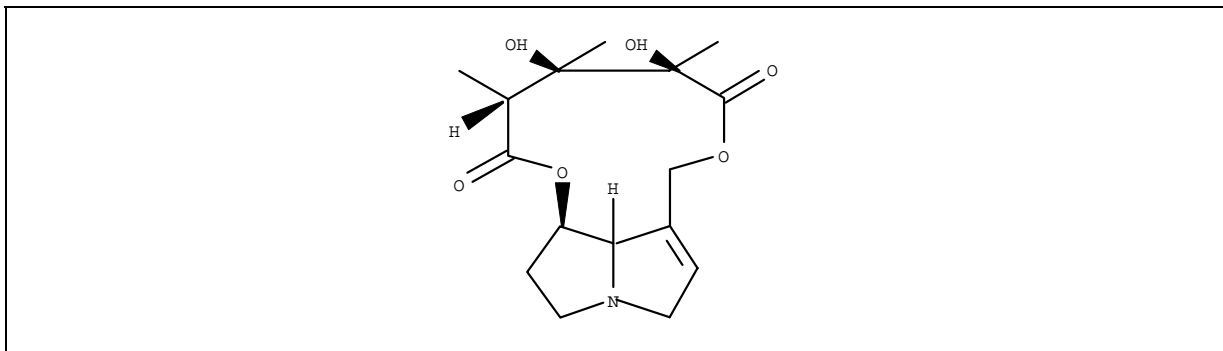


Abbildung 5: Strukturformel von Monocrotalin.

Das von den Tieren aufgenommene MCT wird überwiegend in den Hepatozyten der Leber durch Dehydrierung zu seiner toxischen Form, dem Dehydromonocrotalin, metabolisiert (KAY & HEATH, 1969; YAN & HUXTABLE, 1995). Der Hauptfokus der toxischen Wirkung liegt in der Leber selbst und vor allem in den Endothelzellen der Lungen zu denen der toxische Metabolit über die Blutbahn gelangt (PAN et al., 1991). Dort bewirkt das Dehydromonocrotalin entzündliche Veränderungen verbunden mit einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität (ROSENBERG & RABINOVITCH 1988; WILSON et al., 1989; ITO et al., 2000). Durch diese Veränderungen wird ein Umbau der Gefäßwände induziert, der sich sowohl in einer Proliferation des Gefäßendothels als auch in einer Hypertrophie der an das Endothel angrenzenden Lamina media äußert. Die Effekte dieser Umbauprozesse äußern sich in Form einer zunehmenden Obliteration der Gefäße (LANGLEBEN et al., 1988; ROSENBERG & RABINOVITCH 1988) verbunden mit einer chronischen Erhöhung des Drucks im pulmonalen Gefäßbett (GHODSI et al., 1981; ITO et al., 2000). Da der rechte Ventrikel das Blut unter diesen Bedingungen gegen einen erhöhten Widerstand in die Lungen pumpen muss, bildet sich kompensatorisch eine RHH aus. Diese mündet schließlich in eine RHI mit dem Endpunkt des totalen Pumpversagens des Herzens (KAY et al., 1967; GHODSI & WILL,

1981; WERCHAN et al., 1989; TEUSCHER & LINDEQUIST, 1994; BROWN et al., 1998; TATEBE et al., 1996; DOGRELL & BROWN, 1998).

#### 1.4. Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die zeitlichen und ventrikelspezifischen Veränderungen kardiovaskulärer Parameter des sympathoadrenergen Systems am Modell der MCT-induzierten Rechtsherzhypertrophie/-insuffizienz in Ratten zu untersuchen. Die Versuche umfassten dabei die Messung der NA-Konzentration im Blutplasma als indirekter Index der neurohumeralen Aktivierung, die Bestimmung der NAT-Dichte und -Aktivität, der  $\beta$ -AR-Dichte und -Subtypenverteilung sowie der GRK-Aktivität isoliert im rechten und linken Ventrikel innerhalb von drei Zeitintervallen. Darüber hinaus wurde die Messung der NA-induzierten Kontraktion der Arteria pulmonalis und Aorta thoracica in Abhängigkeit vom Schweregrad der MCT-induzierten pulmonalen Hypertonie/RHH/RHI vorgenommen. Ergänzend zu den erwarteten Veränderungen in der myokardialen  $\beta$ -adrenergen Signaltransduktion sollte dies darüber hinaus auf mögliche Effekte in der vaskulären  $\alpha_1$ -adrenergen Signaltransduktion bei MCT-behandelten Tieren hindeuten.

Der Focus dieser Arbeit lag insbesondere auf der Progression einer RHH nach MCT-Applikation mit dem Schwerpunkt auf die Effekte im sympathoadrenergen System. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sollen darüber hinaus die Frage beantworten, ob die zu beobachtenden Veränderungen Hypertrophie-induzierend, -begleitend oder resultierend sind. Das verwendete MCT-Rattenmodell ist in der Lage Effekte am kardialen AR-System wider zu spiegeln, die den bereits beschriebenen charakteristischen Veränderungen bei herzinsuffizienten Patienten ähneln (YOSHI et al., 1994; SEYFARTH et al., 2000; LEINEWEBER et al., 2000, 2002a; ABRAHAM et al., 2001). Diese Veränderungen treten vorwiegend im rechten Ventrikel auf und sind deshalb gut mit jenen vergleichbar, die bei herzinsuffizienten Patienten mit einer pulmonalen Hypertonie gemacht wurden (BRISTOW et al., 1992). Das MCT-Rattenmodell erlaubt somit zu untersuchen, ob eine durch Druckbelastung verursachte Hypertrophie allein für die Entstehung der charakteristischen Veränderungen im kardialen  $\beta$ -AR-System bei chronischer Herzinsuffizienz verantwortlich ist oder ob die Modifikationen nur auftreten können, wenn die RHH mit einer neurohumeralen Aktivierung verbunden ist.

Bei der Herzinsuffizienz findet man ein gewisses Paradoxon im NA-Haushalt, welches auf die bereits beschriebenen Veränderungen des Uptake<sub>1</sub> zurückgeführt wird. Zum einen liegt eine Erhöhung des pNA-Spiegels vor, der die vermehrte NA-Freisetzung über den synaptischen Nervenendigungen reflektiert (interstitielles NA) und andererseits existiert eine Verarmung der NA-Speicher im myokardialen Gewebe aufgrund einer erhöhten Ausschüttung sowie einer verminderten Wiederaufnahme und neuronalen Neusynthese des NA (CHIDSEY et al., 1965; BRISTOW et al., 1992; PORT et al., 1990; BÖHM 2000). Daraus



lässt sich schließen, dass eine Herzinsuffizienz sowohl zu systemischen als auch zu lokalen neuroendokrinen Veränderungen führt. Es ist jedoch noch nicht hinreichend geklärt, ob diese lokalen Veränderungen des sympathoadrenergen Systems auf systemische Prozesse zurückzuführen sind oder ob sie unter eigenständiger lokaler Kontrolle stehen und wiederum selbst in der Lage sind systemische Veränderungen, wie die Erhöhung des pNA-Spiegels herbeizuführen. Um genauer zwischen diesen lokalen und systemischen Effekten des sympathoadrenergen Systems bei der Herzinsuffizienz differenzieren zu können, wurden diese Effekte ventrikelspezifisch an Herzen, bei denen nur die rechte Kammer Zeichen einer Insuffizienz zeigt, untersucht. Liegen Veränderungen in beiden Ventrikeln, sowohl im insuffizienten als auch im nicht insuffizienten Ventrikel vor, kann man auf systemische Einflussgrößen schließen. Findet man die charakteristischen Veränderungen jedoch nur im insuffizienten Ventrikel sind vorrangig lokale Regulationsmechanismen anzunehmen (BRISTOW et al., 1992).

## 2. Versuchstiere und Methoden

### 2.1. Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Alle Tierexperimente wurden unter Berücksichtigung des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und waren durch die örtliche Kommission für tierexperimentelle Studien (Regierungsspräsidium Halle/Veterinäramt) genehmigt.

Es wurden männliche Wistar Ratten (Original Stamm Wistar Hannover; erworben aus Schönewalde Deutschland) in Gruppen zu je drei Tieren pro Käfig, in einer kontrollierten Umgebung mit einem zwölfstündigen Tag- und Nachtrhythmus und einer Raumtemperatur von 22 °C gehalten.

Bei vorherigen Studien mit diesem Tiermodell wurden in unserer Arbeitsgruppe 60 mg/kg Körpergewicht (KG) MCT verwendet, welches den Tieren intraperitoneal (i.p.) injiziert wurde (LEINWEBER et al., 2000; SEYFARTH et al., 2000; DHEIN et al., 2002). Einleitende Experimente zur erneuten Überprüfung einer angemessenen MCT-Dosis bei den von uns verwendeten neuen Aufzuchtstamm Wistar-Hannover-Ratten zeigten, dass bereits 50 mg MCT/kg KG, subcutan (s.c.) injiziert, eine geeignete Dosis darstellte, um ein Überleben, bei gleichzeitiger Induktion einer pulmonalen Hypertonie mit einer sich entwickelnden RHH/RHI, zu gewährleisten. Die Ratten wurden im Alter von sechs Wochen randomisiert, wobei eine Ratte eine Injektion MCT (50 mg/kg KG) s.c. erhielt und dem entsprechenden Tier aus der Kontrollgruppe ein äquivalentes Volumen 0,9%iger Kochsalzlösung s.c. injiziert wurde (1 ml/kg KG).

Die mit dem Pyrrolizidin-Alkaloid behandelten Tiere zeigten eine geringere Gewichtszunahme als die Kontrolltiere, welches zurückzuführen war auf eine reduzierte Futteraufnahme infolge der zunehmenden toxischen Effekte des MCT. Diese werden wie unter 1.3. beschrieben hauptsächlich durch metabolische Prozesse in der Leber ausgelöst und sind für eine Generalisierung der kardiopulmonalen Beschwerden und die beobachtete Appetitabnahme verantwortlich. Aus diesem Grund durften die MCT-Tiere uneingeschränkt Futter zu sich nehmen (ca. 25 g Trockenfutter/Tag/Tier) und die Futtermenge der Kontrollratten wurde auf die Menge beschränkt, welche durch Rückwaage des verzehrten Futters der MCT-Ratten vom Vortag ermittelt wurde. Jedoch erhielten alle Kontrollratten eine Mindestmenge von 12,5 g pro Tag, um ein Hungern der Tiere und damit verbundene pathophysiologische Prozesse zu vermeiden (TATEBE et al., 1996; LEINWEBER et al., 2000; DHEIN et al., 2002). Alle Versuchstiere hatten freien Zugriff auf Wasser. Die Fütterung der Tiere erfolgte mit Altromin<sup>®</sup>, einem Haltungsfutter für Ratten und Mäuse (Altromin GmbH, Lage, Deutschland) mit folgender Zusammensetzung: 19,0% Rohprotein, 7,0% Rohasche, 6,0% Rohfaser, 4,0% Rohfett, 0,2% Natrium, 1,0% Kalium, 0,9% Calcium, 0,7% Phosphor sowie Vitaminen (15000 IE Vitamin A, 600 IE Vitamin D<sub>3</sub> und Vitamin E 75 mg/kg Futter).

Um den zeitlichen Verlauf der Entstehung einer RHH/RHI, basierend auf dem MCT-induzierten pulmonalen Hochdruck, genauer charakterisieren zu können, wurden die Versuchstiere innerhalb von drei Zeiträumen, zwischen dem 7.-10. Tag, dem 13.-19. Tag und dem 21.-28. Tag nach Applikation des MCT bzw. der 0,9%igen Kochsalzlösung getötet und untersucht (CECONI et al., 1989). Vor allem im dritten Zeitintervall (21.-28.Tag) zeigten die Ratten typische Symptome einer RHI, wie eine ausgeprägte Dys- und Tachypnoe verbunden mit Zyanose und einer allgemeinen Kachexie.

Die Tiere wurden nach Bestimmung des KG durch eine i.p. Injektion mit Pentobarbital (50 mg/kg KG) anästhesiert. Darüber hinaus wurde allen Tiere 2000 IU Heparin, zur Vermeidung einer rechtsventrikulären Thrombenbildung, i.p. injiziert. Anschließend wurde der Brustkorb eröffnet und das Herz, die Leber und die Lunge entnommen. Nach Bestimmung der jeweiligen Organgewichte wurden die Herzen in die entsprechenden Pufferlösungen überführt, um anschließend mit den jeweiligen Untersuchungen fortzufahren, oder sie wurden zügig in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis zum weiteren Gebrauch aufbewahrt.

Vor den entsprechenden Versuchen wurden die Herzen in den rechten und den linken Ventrikel ohne Septum präpariert (RV bzw. LV) und die Ventrikelgewichte bestimmt. Die Gewichte dienen der Berechnung des Quotienten aus RV-Gewicht (RVG)/KG, als ein Marker der RHH. Zusätzlich wurde der Quotient aus RVG/LV+Septum-Gewicht (LVSG) als ein vom KG der Tiere unabhängiger Index für die rechtsventrikuläre Hypertrophie bestimmt. Diese zusätzliche Berechnung wurde vorgenommen, um neben dem RVG/KG einen Index für die ventrikelspezifische Hypertrophie zu haben, bei dem das beobachtete niedrigere KG der MCT-behandelten Ratten, vor allem im dritten Intervall, keinen Einfluß auf die Beurteilung der rechtsventrikulären Hypertrophie hat (SEYFARTH et al., 2000; LEINWEBER et al., 2000, 2002b).

## **2.2. Bestimmung der Plasma-Noradrenalin-Konzentration**

### **2.2.1. Blutentnahme/Plasmagewinnung**

Zur Ermittlung der pNA-Konzentration wurde den anästhesierten Tieren (Pentobarbital 50 mg/kg KG, Heparin 2000 IE) vor Eröffnung des Brustkorbs ca. 1,5-2 ml Blut durch Punktion des retroorbitalen Augenvenenplexus mit Hilfe einer Steigkapillare entnommen.

Das Blut wurde anschließend in eine eisgekühlte Kalium-EDTA-S-Monovette (Sarstedt, Deutschland) überführt und den Proben als Antioxidans pro ml Blut 10  $\mu\text{l}$  einer 10 mM Glutathion-Lösung zugesetzt. Das entnommene Blut wurde bis zur Zentrifugation auf Eis gelagert. Nach der Abtrennung des Plasmas von den korpuskulären Bestandteilen des Blutes durch Zentrifugation (1.700 g, 10 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) wurde der Überstand vom Sediment getrennt

und das so gewonnene Plasma in flüssigen Stickstoff eingefroren und bis zur Bestimmung der pNA-Konzentration bei  $-80\text{ °C}$  gelagert.

### 2.2.2. Ermittlung der Plasma-Noradrenalin-Konzentration mit Hilfe der HPLC

Die Bestimmung der pNA-Konzentration erfolgte durch *High Pressure Liquid Chromatography* (HPLC) nach den Beschreibungen von SCHÄFERS et al. (1997). Dazu wurden  $400\text{ }\mu\text{l}$  des zuvor gewonnenen Plasmas auf ein Vorsäulensystem (Vinyl-Copolymer mit Phenylboronsäure; Merck, Darmstadt) unter Zugabe von Phosphatpuffer I (siehe 2.8.) als mobile Phase gegeben (Flussrate  $0,5\text{ ml/min}$ ) und das NA, einschließlich der anderen im Plasma enthaltenen 1,2-Diolverbindungen, durch Esterbildung retiniert.

Nach 12 min wurde das Elutionsmittel (89 Teile Phosphatpuffer II und 11 Teile Methanol; siehe 2.8.) mit Hilfe eines elektronischen Säulenschaltventils ausgetauscht. Dadurch wurden die Phenylboronsäureester hydrolysiert und NA von der Vorsäule eluiert. Anschließend erfolgte über den Transfer des Eluats auf die analytische Säule ( $12,5\text{ cm}$  LiChrosphor 100, RP 18ec; Merck, Darmstadt) die weitere Auftrennung.

Im nächsten Arbeitsschritt vollzog sich eine dreistufige Nachsäulenderivatisierung zu den detektierbaren fluoreszierenden Trihydroxyindolderivaten. Folgende Reaktionsstufen wurden dabei durchlaufen:

1. Oxidation mit  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  zu Noradrenochinon.
2. Oxidative Zyklisierung zu Noradrenochrom.
3. Intramolekulare Umlagerung zu Trihydroxyindolderivate 3,5,6,-Trihydroxy-1-methylindol bzw. 3,5,6,-Trihydroxyindol nach Hinzufügen von  $0,3\text{ ml/min}$  NaOH ( $5\text{ mol/l}$ ).

Abschließend erfolgte die Fluoreszenzdetektion der Trihydroxyindolderivate bei einer Anregungswellenlänge von  $405\text{ nm}$  und einer Emissionswellenlänge von  $520\text{ nm}$ . Die Quantifizierung der pNA-Konzentrationen wurde durch eine externe Standardisierung unter Verwendung einer Standardlösung für Plasmacatecholamine (Recipe, München) ermöglicht.

## 2.3. Radioligandbindungsstudien an $\beta$ -adrenergen Rezeptoren

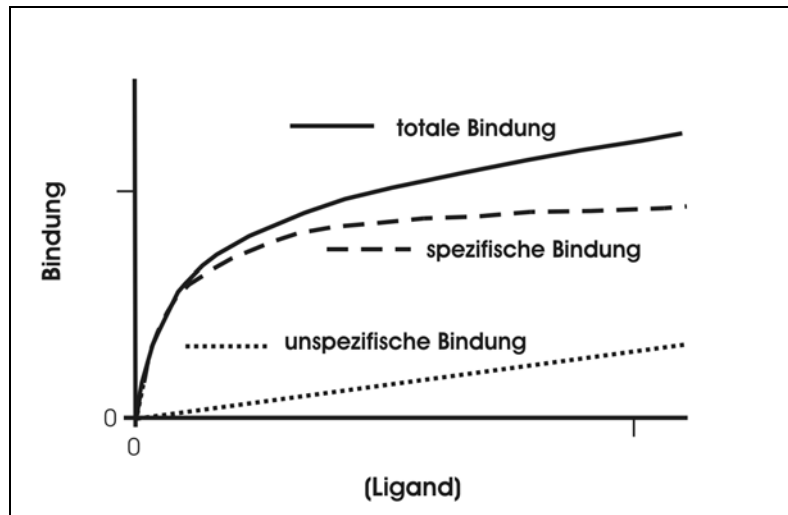
### 2.3.1. Rezeptortheorie/Grundlagen zur Durchführung von Bindungsstudien

Radioligandbindungsstudien werden zur Charakterisierung und quantitativen Bestimmung von Rezeptoren verwendet. Dabei kommen als Liganden radioaktiv markierte Substanzen zum Einsatz, die basierend auf dem Massenwirkungsgesetz spezifisch und reversibel an einen bestimmten Rezeptor in Rohmembranfraktionen oder auf der Oberfläche von intakten Zellen binden. Bei den durchgeführten Bindungsstudien in dieser Arbeit wurden ausschließlich Rohmembranfraktionen verwendet.

Es werden zwei Formen von Bindungsstudien differenziert. Dabei kommen zur quantitativen Bestimmung von Rezeptorkonzentrationen vorrangig Sättigungsbindungsstudien zum Einsatz, wohingegen zur Differenzierung von Rezeptorsubtypen Kompetitionsanalysen verwendet werden (WILLIAMS et al., 1978; MOTULSKY & INSEL, 1982; LEFKOWITZ et al., 1984).

Bei den Sättigungsanalysen wird die Rohmembranfraktion (eingestellt auf eine definierte Proteinkonzentration in mg/ml) mit steigenden Konzentrationen des entsprechenden Radioliganden inkubiert. Nach dessen Bindung an den Rezeptor kommt es zur Ausbildung eines Ligand-Rezeptor-Komplexes, der sich nach einer definierten Inkubationszeit in einem Gleichgewicht mit dem freien, nicht gebundenen Liganden und den Rezeptoren befindet. (Ligand + Rezeptor  $\leftrightarrow$  Ligand-Rezeptor-Komplex). Dabei ist das Ausmaß der Komplexbildung bei konstanter Rezeptormenge von der Konzentration des freien Liganden abhängig. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Reaktion unter Verwendung eines Filtrationsverfahrens gestoppt und die freien ungebundenen Liganden ausgewaschen. Das Ausmaß der Bindung des Radioliganden an die Rohmembranfraktion kann anschließend durch Detektion der Radioaktivität mittels Counter gemessen werden. Aus dem erhaltenen Sättigungsverlauf der spezifischen Ligand-Rezeptor-Bindung lassen sich so die Rezeptordichte  $B_{\max}$  (maximale Sättigung) und die Dissoziationskonstante  $K_D$  ermitteln. Die Dissoziationskonstante  $K_D$  stellt dabei die Konzentration [-log M] od. [-log mol/l] dar, bei der 50% der Rezeptoren durch den Liganden besetzt sind (siehe 2.3.5).

Neben diesem spezifischen Bindungsverhalten des Radioliganden gegenüber dem entsprechenden Rezeptor existiert jedoch noch eine unspezifische Bindung, bei der der Ligand außerhalb der spezifischen Bindungsstelle an Membranstrukturen unspezifisch bindet. Sie ist in der Regel abhängig von der Höhe der Ligandenkonzentration, ist nicht sättigbar und folgt daher einem linearen Verlauf. Die Gesamtbindung setzt sich demzufolge immer als Summe aus spezifischer und unspezifischer Bindung zusammen (totale Bindung = spezifische Bindung + unspezifische Bindung; Abbildung 6). Zur Quantifizierung der spezifischen Bindung werden in Parallelansätzen die Gesamtbindung und die unspezifische Bindung getrennt voneinander bestimmt und anschließend ihre Differenz berechnet (spezifische Bindung = totale Bindung – unspezifische Bindung; Abbildung 6).



**Abbildung 6: Graphische Darstellung der Ergebnisse einer typischen Bindungsstudie; modifiziert nach MOTULKY & INSEL (1982).**

Den Anteil der unspezifischen Radioligandenbindung erfasst man experimentell, indem die spezifischen Bindungsstellen durch einen zweiten, nicht radioaktiv markierten Liganden, abgesättigt werden und nach Zugabe des Radioliganden der Anteil der radioaktiv markierten unspezifischen Bindungsstellen mit dem Counter erfasst wird.

Bei den zur Differenzierung von Rezeptorsubtypen verwendeten Kompetitionsbindungsstudien wird eine konstante Konzentration an radioaktiv markierten Liganden, durch steigende Konzentrationen an subtypenspezifischen (Agonist bzw. Antagonist) nicht radioaktiv markierten Liganden (Kompetitor) aus den Rezeptorbindungen verdrängt. Der verwendete Radioligand sowie der Kompetitor sollten annähernd identische Affinitäten gegenüber den Bindungsstellen der entsprechenden Rezeptorsubtypen aufweisen, um eine möglichst gleichförmige Verdrängung zu gewährleisten. Nach Ablauf einer definierten Inkubationszeit wird die Reaktion gestoppt und die freien ungebundenen Liganden, analog den Sättigungsanalysen, durch zügiges Filtrieren und Waschen entfernt. Anschließend erfolgt die Detektion der gebundenen Radioliganden im Counter.

Darüber hinaus gestatten die durch die Kompetitionsanalysen erhaltenen Daten, bei bekanntem  $K_D$ -Wert des Radioliganden, die Bestimmung der Affinität des nicht markierten Liganden (Kompetitor) zum jeweiligen Rezeptor durch die Berechnung des  $K_I$ -Wertes nach der Gleichung nach CHENG & PRUSOFF (1973) unter Verwendung der Größe  $IC_{50}$  (siehe 2.3.5.).

### 2.3.2. Herstellung/Präparation der Rohmembranfraktion

Die Herstellung einer homogenen kardialen Rohmembransuspension, die das Ausgangsmaterial für die folgenden Bindungsstudien darstellte, orientiert sich an der Methode von BRODDE et al. (1998).

Die frisch entnommenen Herzen wurden von überschüssigem Fett- und Bindegewebsresten befreit, gewogen und in eisgekühltem Kaliumhydrogencarbonatpuffer ( $\text{KHCO}_3$ , siehe 2.8.) überführt. Nach anschließender Präparation des rechten und linken Ventrikels erfolgte die Bestimmung der einzelnen Ventrikelgewichte. Die so vorbereiteten und gewogenen Ventrikel wurden in je 5 ml eisgekühlten  $\text{KHCO}_3$ -Puffer gegeben und gründlich mit einer Schere zerkleinert. Anschließend fand die stufenweise Homogenisierung des Gewebes mit Hilfe des Ultra-Turrax (Ultra-Turrax T25, Janhe & Krunkel IKA<sup>®</sup> Labortechnik, Deutschland), einmalig auf der höchsten Stufe (25.000 U/min) für 10 s und zweimal bei 7/8 des maximalen Schubes (18.000 U/min) für je 20 s in einminütigen Intervallen, statt. Die Proben befanden sich während des gesamten Vorgangs auf Eis (4 °C).

Die erhaltene homogene Suspension wurde mit  $\text{KHCO}_3$ -Puffer auf 20 ml aufgefüllt und zentrifugiert (1.600 g, 15 min, 4 °C). Nach dieser ersten Zentrifugation wurde der Überstand über vier Lagen Mull filtriert und erneut, nun mit dem SM 24 Rotor, für 20 min bei 4 °C und 20.000 g zentrifugiert (Sorvall<sup>®</sup> RC-5B, DuPont Company, Newtown, USA). Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Pellet anschließend mit 1 ml  $\text{KHCO}_3$ -Puffer resuspendiert. Die entstandene Rohmembranfraktion konnte nun entweder in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zu einer Woche gelagert oder umgehend für den Bindungsversuch weiterverwendet werden. Dazu wurde die Suspension erneut auf 5 ml mit  $\text{KHCO}_3$ -Puffer aufgefüllt und es erfolgte ein weiterer Zentrifugationsvorgang (s.o.). Der Überstand wurde wiederum verworfen und das Pellet für den nun folgenden Bindungsversuch in 1 ml Inkubationsgebrauchspuffer (siehe 2.8.) resuspendiert.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der aufbereiteten Membranen erfolgte als Doppelansatz nach BRADFORD (1976) mit Hilfe eines UV/VIS Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 595 nm. Rinder- $\gamma$ -Globulin diente dabei als Standard.

### 2.3.3. Sättigungsanalysen zur Bestimmung der $\beta$ -Adrenozeptor-Dichte

Nach der Vorbereitung der Rohmembranfraktion einschließlich der photometrischen Messung ihrer jeweiligen Proteinkonzentration wurde die Einstellung des Proteingehaltes von 20  $\mu\text{g}$  auf 150  $\mu\text{l}$  (Lösung = Inkubationspuffer + Protein) vorgenommen.

Die Bestimmung der  $\beta$ -AR-Dichte erfolgte in Anlehnung an die Methode nach BRODDE et al. (1995) unter Verwendung des radioaktiv markierten Liganden  $(-)[^{125}\text{J}]\text{-Jodocyanopindolol}$ .

Bei diesem Radioliganden handelt es sich um einen unspezifischen  $\beta_1/\beta_2$ -AR-Antagonisten mit einer spezifischen Aktivität von 2200 Ci/mmol.

Die Ermittlung der totalen und unspezifischen Bindung war konzipiert als Doppelansatz mit sechs steigenden Konzentrationen des Radioliganden (5-200 pM). Zur Ermittlung der unspezifischen Bindung wurde der nicht-selektive  $\beta$ -AR-Antagonist CGP 12177 (100  $\mu$ M) verwendet. Das Volumen des Reaktionsansatzes betrug 250  $\mu$ l und setzte sich wie folgt zusammen:

- 50  $\mu$ l Inkubationsgebrauchspuffer oder 50  $\mu$ l CGP 12177 (final 100  $\mu$ M)
- 50  $\mu$ l Inkubationsgebrauchspuffer mit  $-(-)[^{125}\text{J}]\text{-Jodocyanopindolol}$  (5-200 pM)
- 150  $\mu$ l Membranlösung (eingestellt auf 20  $\mu$ g Proteingehalt)

Der Ansatz wurde für 90 min bei 37 °C im Schüttelwasserbad (Stufe VI) inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde der Reaktionsvorgang durch Zugabe von 10 ml eiskaltem Inkubationspuffer sowie Abtrennung freier, nicht an Membranen gebundener Radioliganden mit Hilfe der Vakuumfiltration über Whatman GF/C Filter gestoppt (Harvester, Brandel Biomedical Research and Development Lab. Inc., Gaithersburg; USA). Nach viermaligem Waschen der Probengefäße und Filter mit je 2 ml eiskaltem Inkubationspuffer wurden die ausgestanzten Filterpapiere in Counterröhrchen überführt und der Anteil an  $-(-)[^{125}\text{J}]\text{-Jodocyanopindolol}$ -markierten Rezeptoren umgehend in einem Gamma-Counter (Auto-Gamma Cobra™ II, Canberra-Packard, Meriden; USA; Zählausbeute 80%) bestimmt.

Die spezifische  $-(-)[^{125}\text{J}]\text{-Jodocyanopindolol}$ -Bindung wurde berechnet als Differenz aus den Werten der totalen  $-(-)[^{125}\text{J}]\text{-Jodocyanopindolol}$ -Bindung und den Ergebnissen der unspezifischen  $-(-)[^{125}\text{J}]\text{-Jodocyanopindolol}$ -Bindung in Gegenwart des nicht selektiven  $\beta$ -AR-Antagonisten CGP 12177 (siehe 2.3.5.).

#### **2.3.4. Kompetitionsanalysen zur Subtypisierung von $\beta$ -Adrenozeptoren**

Das Verfahren zur Herstellung der Rohmembransuspensionen für die Experimente zur Bestimmung der  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Subtypverteilung gleicht in seiner Ausführung dem der Sättigungsanalyse. Die Einstellung des Proteingehaltes von 20  $\mu$ g auf 150  $\mu$ l Membranlösung erfolgte ebenfalls analog.

Die Kompetitionsanalysen wurden unter Verwendung von CGP 20712A durchgeführt, einem  $\beta$ -AR-Antagonisten mit einer 1000fach größeren Affinität gegenüber  $\beta_1$ -AR verglichen mit  $\beta_2$ -AR (DOOLEY et al., 1986). Dieser verwendete, nicht radioaktiv markierte selektive  $\beta_1$ -AR-Antagonist, verdrängt mit steigender Konzentration (1 nM bis 100  $\mu$ M) den Radioliganden



-(-)[<sup>125</sup>J]-Jodocyanopindolol (konstante Konzentration von 100 pM) zunehmend aus seiner spezifischen Bindung zum β<sub>1</sub>-AR. Die Messung des Anteils der unspezifischen Bindung geschah wiederum in Gegenwart des nicht selektiven β-AR-Antagonisten CGP 12177 (konstante Konzentration von 100 μM).

Sämtliche Werte wurden als Doppelansatz mit einem Ansatzvolumen von je 250 μl bestimmt, dass sich wie folgt zusammensetzte:

- 50 μl Inkubationsgebrauchspuffer ± 50 μl CGP 20712A (1 nM bis 100 μM; insgesamt 21 Konzentrationen) oder CGP 12177 (100 μM)
- 50 μl -(-)[<sup>125</sup>J]-Jodocyanopindolol (100 pM)
- 150 μl Membranlösung (eingestellt auf 20 μg Proteingehalt)

Der Inkubationsvorgang, die anschließende Vakuumfiltration und die Detektion der markierten Rezeptoren im Gamma-Counter vollzogen sich zu den gleichen Bedingungen wie bei den Sättigungsanalysen.

### 2.3.5. Auswertung der Radioligandbindungsstudien

#### Sättigungsanalysen

Wie unter 2.3.1. bereits erwähnt leiten sich Sättigungsexperimente vom Massenwirkungsgesetz ab, dessen Grundlage die Reaktion zwischen einem Liganden und seinem Rezeptor bildet. Dabei gilt das einfache Reaktionsmodell:



Das Ausmaß der Bindung des Liganden an seinen Rezeptor steht, wie Gleichung (1) zeigt, in Abhängigkeit zu der vorliegenden freien Liganden- bzw. Rezeptorkonzentration und ist darüber hinaus abhängig von den Geschwindigkeitskonstanten für die Hin- und Rückreaktion ( $k_{+1}$  und  $k_{-1}$ ). Nach Einstellung eines Gleichgewichts kann die Gleichung wie folgt umgeformt werden:

$$K_D = \frac{[\text{Ligand}] [\text{Rezeptor}]}{[\text{Ligand x Rezeptor}]} = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} \quad (2)$$

$$\begin{aligned} K_D &= \text{Dissoziationskonstante} \\ k_{+1} &= \text{Assoziationsgeschwindigkeitskonstante} \\ k_{-1} &= \text{Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante} \end{aligned}$$

Bei einer 50%igen Besetzung der Rezeptoren durch den Liganden d.h.  $[\text{Rezeptor}] = [\text{Ligand} \times \text{Rezeptor}]$  folgt aus Gleichung (2), dass die Dissoziationskonstante  $K_D$  der freien Ligandenkonzentration ( $[\text{Ligand}]$ ) entspricht. Somit ist  $K_D$  spezifisch für jeden Bindungsversuch als ein Maß für die Konzentration an freien Liganden im Fall einer 50%igen Rezeptorbesetzung zu werten. Sie verhält sich umgekehrt proportional zur Affinität eines Liganden gegenüber einem bestimmten Rezeptor, d.h. je höher die vorliegende Konzentration an freien Liganden bei 50%iger Rezeptorbesetzung, desto geringer ist die Affinität des Liganden gegenüber diesem Rezeptor.

Einen weiteren versuchsspezifischen Parameter stellt  $B_{\max}$  dar, der die Gesamtheit aller Rezeptoren widerspiegelt und sich aus der Summe von freien und besetzten Rezeptoren zusammensetzt. Somit berechnet sich  $K_D$  unter Einbeziehung von Gleichung (2) und Verwendung von  $B_{\max}$  aus folgender Formel:

$$K_D = \frac{(B_{\max} \times [\text{Ligand} \times \text{Rezeptor}]) \times [\text{Ligand}]}{[\text{Ligand} \times \text{Rezeptor}]} \quad (3)$$

Durch Umstellen von (3) unter Berücksichtigung der einzelnen Konzentrationen zu einander erhält man eine Gleichung, die die spezifische Bindung  $= [\text{Ligand} \times \text{Rezeptor}]$  der Sättigungsanalyse beschreibt:

$$\text{spezifische Bindung} = \frac{B_{\max} \times [\text{Ligand}]}{K_D \times [\text{Ligand}]} \quad (4)$$

Die maximale Rezeptorbesetzung ist experimentell jedoch nicht erfassbar. Dies lässt sich an der graphischen Darstellung der spezifischen Bindung  $[\text{Ligand} \times \text{Rezeptor}]$  gegen die steigende Konzentration an freien Liganden  $[\text{Ligand}]$  demonstrieren (siehe 2.3.1., Abbildung 6).

Der Graph zeigt eine Hyperbel bei der sich, mit zunehmender Erhöhung der freien Ligandenkonzentration, die Konzentration der spezifischen Bindung  $[\text{Ligand} \times \text{Rezeptor}]$  der Konzentration der Gesamtheit aller Rezeptoren ( $B_{\max}$ ) nur asymptotisch nähert und somit experimentell nicht vollständig erreicht werden kann. Mit Hilfe des Computer-Statistikprogramms GraphPad™ Prism® 3.00 (GraphPad Software, Inc. San Diego, Kalifornien USA) konnte jedoch die Berechnung der Dissoziationskonstanten  $K_D$  sowie die Lage der horizontalen Asymptote als Index für  $B_{\max}$  rechnerisch ermittelt werden (siehe 2.7.).

## Verdrängungsanalysen

Das Prinzip dieses Analyseverfahrens beruht, wie unter 2.3.1. beschrieben, auf der Verdrängung eines Radioliganden mit konstanter Konzentration aus seiner spezifischen Rezeptorbindung, durch steigende Konzentrationen an nicht radioaktiv markierten Liganden (Kompetitor). Der versuchsspezifische Parameter  $EC_{50}$  spiegelt dabei die Konzentration des nicht markierten Kompetitors wieder, bei der 50% eines an den Rezeptor gebundenen markierten Liganden (spezifische Ligandenbindung) verdrängt werden. Dabei hängt der Umfang der Verdrängung bei definierter  $EC_{50}$  vom molaren Verhältnis ab mit welchem der Austausch von Radioligand durch den Kompetitor erfolgt. Dieses Verhältnis wird durch den Hill-Koeffizienten ausgedrückt und ist für die Steigung der jeweiligen Verdrängungskurve verantwortlich. Erfolgt die Verdrängung des Radioliganden aus seiner Bindung zum Rezeptor gleichförmig, in einem molaren Verhältnis von eins zu eins, beträgt der Hill-Koeffizient in der Regel eins. Dies zeigt sich bei einem Kompetitor mit gleicher Affinität gegenüber den jeweiligen Rezeptorbindungsstellen und drückt sich graphisch in einer monophasischen steilen Verdrängungskurve aus. Finden sich dagegen unterschiedliche Affinitäten gegenüber Bindungsstellen erfolgt eine nicht gleichförmige biphasische Verdrängung mit Abweichung des Hill-Koeffizienten von 1. Diese unterschiedlichen Affinitäten liegen vor, wenn die zu untersuchenden Gewebe zwei unterschiedliche Rezeptorsubtypen aufweisen. Somit erklärt sich die Möglichkeit der Differenzierung verschiedener Subtypen von Rezeptorbindungsstellen.

Die Berechnung der Dissoziationkonstante von Kompetitor und Rezeptor ( $K_I$ ) erfolgt nach der Gleichung von CHENG & PPRUSSOF (1973):

$$K_I = \frac{EC_{50}}{\frac{[Ligand]}{K_D} + 1} \quad (5)$$

Die Auswertung der Konkurrenzexperimente wurde ebenfalls unter Verwendung des Computer-Statistikprogramms GraphPad™ Prism® 3.00 (GraphPad Software, Inc. San Diego, Kalifornien USA) mit Hilfe iterativer, nicht linearer Kurvenanpassung durchgeführt (siehe 2.7.).

Für die Gültigkeit der oben genannten Reaktionsmodelle, müssen bestimmte Voraussetzungen eingehalten werden (MOTULSKY, 1996).

1. Die Bindung zwischen Ligand und Rezeptor erfolgt nach dem Massenwirkungsgesetz. Dies bedeutet, dass eine reversible Bindung vorliegen muß durch die es zu keiner Veränderung der Rezeptor- bzw Ligandeneigenschaften kommen darf. Darüber hinaus

sollten alle Rezeptoren gleich gut für den Liganden zu besetzen sein, was durch die Präparation einer einheitlichen homogenen Rohmembransuspension gewährleistet wird.

2. Die Einstellung eines Gleichgewichts zwischen dem freien Liganden bzw. Rezeptor und dem Ligand-Rezeptor-Komplex muß durch eine geeignete Inkubationszeit und -temperatur erreichbar sein. Des Weiteren sollte das Gleichgewicht (die Bindung) durch einen zügigen Wasch- und Filtrationsvorgang aufrecht zu erhalten sein, sodass möglichst geringe Verluste infolge eines Zerfalls des Ligand-Rezeptor-Komplexes auftreten.
3. In den vorbereiteten Gewebesuspensionen sollten keine endogenen Liganden vorkommen. Diese könnten schon vorher Rezeptoren besetzen, bzw. mit dem experimentell zugeführten Liganden um die Bindungsstellen konkurrieren.
4. Die Menge an unspezifisch gebundenen Radioliganden sollte 5% der verwendeten Gesamtligandenkonzentration nicht überschreiten.

#### **2.4. Bestimmung der G-Protein-gekoppelten Rezeptor Kinase-Aktivität**

Die G-Protein-gekoppelte Rezeptor Kinase (GRK) existiert am Herzen in den drei Formen GRK2, GRK3 und GRK5 mit einer ausgeprägten Dominanz der GRK2 (IACCARINO & KOCH, 1999). So ist vor allem die GRK2, welche auch bekannt ist als  $\beta$ -Adrenorezeptor-Kinase 1 ( $\beta$ ARK 1), dafür verantwortlich  $\beta$ -AR bei übermäßiger Agonisten-Stimulation zu phosphorylieren und sie damit vom  $G_s$ -Protein-Adenylyl Zylase-System zu entkoppeln (FREEDMAN et al., 1995; KRUPNICK & BENOVIC, 1998). Die Aktivität des Enzyms spielt somit eine Schlüsselrolle bei den Veränderungen innerhalb der  $\beta$ -adrenergen Signaltransduktion bei RHH bzw. RHI, bei denen erhöhte Konzentrationen von agonistisch wirkenden Substanzen (wie NA) vorliegen.

Die Ermittlung der GRK2-Aktivität wurde mit geringen Modifikationen nach BENOVIC et al. (1987) durchgeführt. Bei dieser Methode wird lichtabhängig Rhodopsin spezifisch durch die GRK phosphoryliert. Dies geschieht in Abhängigkeit von der Phosphorylierungspotenz der drei im Herzen coexprimierten GRK-Formen: GRK2  $\gg$  GRK3 = GRK5 (DE BLASI et al., 1995). Der Einbau von radioaktiv-markiertem Phosphor (Verwendung von  $\gamma$ -[ $^{32}$ P]-ATP) in das Rhodopsin stellt dabei ein Maß für die GRK-Aktivität dar.

### 2.4.1. Aufbereitung der ventrikulären Zytosol- und Membranfraktion

Es wurden je 100 mg rechts- und linksventrikuläres Gewebe (siehe 2.1.) in 1 ml eiskalten Lyse-Puffer (siehe 2.8.) gegeben, sorgfältig mit einer Schere zerkleinert und anschließend mit Hilfe des Ultra-Turrax T25 für 60 Sekunden (25.000 U/min) homogenisiert. Nach Zusatz von 10 µl einer 5 M NaCl-Lösung (Endkonzentration von 50 mM) und Inkubation für 10 min auf Eis wurde die Suspension für 30 min zentrifugiert (50.000 g, 4 °C). Anschließend wurde der Überstand (zytosolische Fraktion) in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Analyse auf Eis gelagert. Das durch die Zentrifugation entstandene Pellet (Membranfraktion) wurde nach Zugabe von 950 µl Lyse-Puffer und 50 µl der 5 M NaCl-Lösung (Endkonzentration von 250 mM) erneut mit dem Ultra-Turrax T25 für 60 Sekunden resuspendiert (9.500 U/min, 4 °C). Nach einer fünfzehnminütigen Inkubation auf Eis wurde die Probe ein weiteres Mal für 30 min zentrifugiert (50.000 g, 4 °C). Der nach diesem zweiten Zentrifugationsvorgang gewonnene Überstand enthielt nun die membranassoziierten Proteine (Membranfraktion) und wurde ebenfalls in ein neues Reaktionsröhrchen überführt. Das Pellet wurde verworfen.

Die so erhaltenen Zytosol- und Membranfraktionen wurden mit Hilfe von 300 µl einer 50%igen Diethylaminoethyl-Saphacel-Suspension (eingestellt auf pH 7 mit Lyse-Puffer) innerhalb von 15 min im Batch-Verfahren von NaCl befreit. Die Proben befanden sich während des Vorgangs auf Eis. Im Anschluß daran wurde die Diethylaminoethyl-Saphacel-Matrix durch Zentrifugation (2.500 g, 10 min, 4 °C) wieder entfernt. Das Volumen der Überstände wurde durch Mikrofiltration (Ultracel-YM 30000; Millipore; Eschborn, Deutschland) auf ein Endvolumen von 50 bis 100 µl reduziert.

Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte anschließend als Doppelansatz wie unter 2.3.2. beschrieben nach BRADFORD (1976).

### 2.4.2. Lichtabhängige Rhodopsin-in vitro-Phosphorylierung

Es wurden je 20 µg zytosolische und 10 µg Membranfraktion beider Ventrikel als Doppelansatz mit 200 pmol Rhodopsin in 60 µl Assay-Puffer (siehe 2.8.) im Dunkeln bei 4 °C gemischt. Die lichtabhängige Rhodopsin-Phosphorylierung wurde durch Inkubation der Ansätze in Gegenwart von Licht für 30 min bei 30 °C vorgenommen. Der Reaktionsvorgang wurde durch Zugabe von 250 µl eiskalten Lyse-Puffer gestoppt und die Proben unverzüglich bei Raumtemperatur zentrifugiert (10.000 g, 10 min). Die Überstände wurden verworfen und die gewonnenen Pellets in 30 µl zweifach-konzentriertem Laemmli-Puffer (LAEMMLI, 1970) durch dreißigminütiges kräftiges Schütteln resuspendiert. Die Proben wurden anschließend einer gelelektrophoretischen Auftrennung unter Verwendung von 10%igen Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gel (25 mA/Gel für 90 min) unterzogen. Die so entstandenen Gele

wurden, in Anlehnung an die Beschreibungen von REISSNER et al. (1975), mit Coomassie-Farblösung für 30 min gefärbt und anschließend für 2-3 Stunden mit 30%igem Methanol und 10%iger Essigsäure entfärbt. Die Rhodopsinbanden (~35 kDa) wurden aus dem Gel geschnitten und ihre Radioaktivität nach CERENKOV im Beta-Counter (Beckmann LSC) bestimmt.

Darüber hinaus wurden separate Experimente zur Überprüfung der Spezifität der Rhodopsin-Phosphorylierung durch die GRK2 durchgeführt. In diesen zusätzlichen Experimenten wurden Zytosol- und Membranfraktionen aus linksventrikulärem Gewebe von mit Kochsalzlösung-behandelten Tieren verwendet und die Enzymaktivität bei Dunkelheit (GRK nicht in der Lage Rodopsin zu phosphorylieren), in Gegenwart von Licht sowie lichtabhängig unter Zugabe von 1 mmol/l Heparin, einem spezifischen Inhibitor der GRK2, ermittelt.

## **2.5. Untersuchungen am kardialen Noradrenalin-Transporter**

Wie unter 1.1. beschrieben wird das aus den sympatischen Nervenendigungen freigesetzte NA durch unterschiedliche Mechanismen inaktiviert. Den Hauptinaktivierungsweg stellt dabei der Uptake<sub>1</sub> dar, über den der Neurotransmitter in die Synapse (Axoplasmamembran) wieder aufgenommen wird.

Die vorliegenden Untersuchungen umfassten die Quantifizierung der NAT-Dichte und NAT-Aktivität in links- und rechtsventrikulären Membranen aller drei Altersstufen unter Anwendung von Sättigungsbindungsstudien mit [<sup>3</sup>H]-Nisoxitin bzw. durch die Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-Noradrenalinhydrochlorid in Gewebestücke (Grundlagen 2.3.1).

### **2.5.1. Präparation der Rohmembranfraktion**

Die Membranpräparation aus rechten und linken Ventrikeln der mit MCT-behandelten Ratten und den entsprechenden Kontrollen erfolgte mit einigen geringen Modifikationen nach SHEARMAN & MEYER (1997) und LEINEWEBER et al. (2000).

Die gefrorenen Ventrikel wurden in je 5 ml 0,25 M Saccharose-Assay-Puffer (siehe 2.8.) auf Eis stehend aufgetaut. Der gründlichen Zerkleinerung des Gewebes durch eine Schere folgte die stufenweise Homogenisierung mit Hilfe eines Ultra-Turrax (Ultra-Turrax T25, Janne & Krunkel IKA<sup>®</sup> Labortechnik, Deutschland). Dies geschah einmalig auf der höchsten Stufe für 10 s und zweimal bei  $\frac{2}{3}$  des maximalen Schubes für je 20 s in einminütigen Intervallen. Die Proben befanden sich während des gesamten Vorgangs auf Eis (4 °C). Die homogene Suspension wurde anschließend in ein Zentrifugenröhrchen überführt, auf 10 ml mit Saccharose-Assay-Puffer aufgefüllt und zentrifugiert (1.200 g, 10 min, 4 °C). Nach dieser ersten Zentrifugation wurde der Überstand in ein Sorvallröhrchen gegeben und erneut, nun

mit dem SM 24 Rotor (Sorvall) zentrifugiert (20.000 g, 20 min, 4 °C). Das entstandene Pellet wurde mit 1 ml des Saccharose-Puffers resuspendiert und wieder auf 10 ml aufgefüllt. Es schloss sich ein weiterer Zentrifugationsvorgang zu den vorherigen Bedingungen an. Das Pellet wurde nun in 1 ml eiskaltem Assay-Puffer (ohne Saccharose) resuspendiert und entweder in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zu einer Woche gelagert oder umgehend für den Bindungsversuch mit [<sup>3</sup>H]-Nisoxitin weiterverwendet.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der aufbereiteten Membranen erfolgte analog zu Punkt 2.3.2. als Doppelansatz nach BRADFORD (1976). Für den Bindungsversuch mit [<sup>3</sup>H]-Nisoxitin betrug die eingestellte Proteinmenge 100 µg auf 400 µl (Lösung = Assay-Puffer + Protein).

### 2.5.2. Bestimmung der Noradrenalin-Transporter-Dichte

Die Ermittlung der totalen und unspezifischen Bindung erfolgte als Doppelansatz mit sechs steigenden Konzentrationen des spezifischen Uptake<sub>1</sub>-Inhibitors [<sup>3</sup>H]-Nisoxitin (spezifische Aktivität: 80 Ci/mmol; 0,3125 bis 10 nM). Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurde der spezifische Uptake<sub>1</sub>-Inhibitor Desipramin in einer Konzentration von 1 µM verwendet. Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes betrug 500 µl und setzte sich wie folgt zusammen:

- 50 µl Assay-Puffer ± Desipramin (final 1 µM)
- 400 µl präparierte Membran (eingestellt auf 100 µg Membranprotein)
- 50 µl Assay-Puffer mit [<sup>3</sup>H]-Nisoxitin (0,3125 bis 10 nM)

Vor Zugabe des [<sup>3</sup>H]-Nisoxitin in der jeweiligen Konzentration wurden die Reaktionsansätze für 15 min bei Raumtemperatur vorinkubiert.

Der Ansatz wurde anschließend für drei Stunden bei 4 °C inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit (Einstellung eines Ligand-Rezeptor-Gleichgewichts) wurde der Reaktionsvorgang durch Hinzufügen von 4 ml eiskaltem (4 °C) Assay-Puffer sowie nachfolgender Abtrennung von freien, nicht an Membranen gebundenen Radioliganden durch Vakuumfiltration über Whatman GF/C Filter (Filtrationstopf; Millipore GmbH, Eschborn; Deutschland) gestoppt. Insgesamt wurden die Probenröhrchen bzw. Filter dreimal mit je 4 ml Assay-Puffer gewaschen. Nach Beendigung dieses Arbeitsschrittes wurden die Filterpapiere in vorbereitete Szintillationsgefäße überführt und für 12 h unter dem Abzug getrocknet. Den getrockneten Filtern wurde je 4 ml Szintillationslösung (Lumasafe<sup>TM</sup> Plus, Lumec; Groningen, Niederlande) zugesetzt und für 10 min intensiv geschüttelt. Abschließend erfolgte die Detektion der [<sup>3</sup>H]-Radioaktivität mit dem Liquid Szintillation Analyzer (Beckmann β-Counter, Ausbeute 61 %).

Die spezifische [<sup>3</sup>H]-Nisoxitin-Bindung wurde berechnet als Differenz aus den Werten der totalen [<sup>3</sup>H]-Nisoxitin-Bindung und der unspezifischen [<sup>3</sup>H]-Nisoxitin-Bindung. Sie betrug annähernd 85% bei Verwendung von 2 nM [<sup>3</sup>H]-Nisoxitin.

### 2.5.3. Bestimmung der Noradrenalin-Transporter-Aktivität

Die Ermittlung der ventrikulären NAT-Aktivität basierte auf den Beschreibungen von LIANG et al. (1989) und LEINEWEBER et al. (2000) über die Aufnahme von Tritium-markierten D,L-Noradrenalinhydrochlorid (spezifische Aktivität von 13,5 Ci/mmol) in präparierte Gewebestücke.

Nach Entnahme, Präparation und Abwaage der Herzen wurden der rechte und der linke Ventrikel in je 5 ml begasten (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) mks-Puffer (siehe 2.8.) gegeben und anschließend mit dem McIlwain-Gewebe-Chopper (Backhofer; Reutlingen, Deutschland) in 250 x 250 µm große Gewebestücke zerkleinert. Nach diesem Arbeitsschritt wurden die Slices in frischen mks-Puffer überführt (10 mg Gewebe auf 400 µl Puffer).

Die Ermittlung der [<sup>3</sup>H]-NAT-Aktivität wurde im Doppelansatz durchgeführt. Zur Bestimmung der totalen Aufnahme erfolgte die fünfzehnminütige Inkubation des Reaktionsansatzes bei 37 °C im Wasser-Schüttelbad und die Bestimmung der unspezifischen Aufnahme parallel bei 4 °C jeweils nach Zugabe des [<sup>3</sup>H]-NA in aufsteigenden Konzentrationen (s.u.). Das Gesamtvolumen je Reaktionsansatz betrug 500 µl und setzte sich wie folgt zusammen:

- 50 µl mks-Puffer + Corticosteron (40 µM; spezifischer Uptake<sub>2</sub>-Antagonist)
- 400 µl der Gewebe-Puffer-Suspension
- 50 µl [<sup>3</sup>H]-NA (1,56; 3,125; 6,25; 12,5; 25 nM)

Der Inkubation schloss sich eine zügige Filtration der Proben über Whatman GF/C Filter zu den gleichen Bedingungen wie unter 2.5.2. an. Abschließend erfolgte das Überführen der Filterpapiere in vorbereitete Szintilationsgefäße, welche nach Zugabe von 500 µl Trichloressigsäure bei 4 °C über Nacht ruhten. In dieser Ruhezeit wurden die Gewebestücke durch die Säure „aufgebrochen“ und das NA freigesetzt. Am nächsten Tag wurde die Detektion der Radioaktivität nach vorherigem Zusatz von je 4 ml Szintilationslösung (Lumasafe™ Plus, Lumec; Groningen, Neiderlande) pro Szintilationsgefäß vorgenommen (2.5.2).

Die spezifische NAT-Aktivität entsprach dabei der Differenz aus totaler NAT-Aktivität (Inkubation bei 37 °C) minus unspezifischer NAT-Aktivität (Inkubation bei 4 °C).



#### 2.5.4. Auswertungen zum Noradrenalin-Transporter

Die erhaltenen Daten aus den Bindungsversuchen mit [<sup>3</sup>H]-Nisoxitin wurden in Anlehnung an die Grundlagen und Methoden zur Auswertung der durchgeführten Sättigungsanalysen im  $\beta$ -adrenergen System analysiert (2.3.1. und 2.3.5.). Deren Gültigkeit setzte ebenfalls die Einstellung eines Gleichgewichts nach dem Massenwirkungsgesetz zwischen [<sup>3</sup>H]-Nisoxitin und dessen Bindung an den NAT voraus ( $[^3\text{H}]\text{-Nisoxitin} + \text{NAT} \leftrightarrow [^3\text{H}]\text{-Nisoxitin-NAT-Komplex}$ ). Das Ausmaß der maximalen Bindung ( $B_{\text{max}}$ ) und die Dissoziationskonstante  $K_D$  von [<sup>3</sup>H]-Nisoxitin wurden ebenfalls mit Hilfe des Computer-Statistikprogramms GraphPad<sup>TM</sup> Prism<sup>®</sup> 3.00 durch nicht-lineare Kurvenanpassung berechnet (2.7.).

Die NAT-Aktivität wurde bestimmt in pmol [<sup>3</sup>H]-NA/mg Gewebe/15min für die jeweils eingesetzten Konzentrationen von [<sup>3</sup>H]-NA im Konzentrationsbereich von 1,56 bis 25 nM. In diesem Konzentrationspektrum erfolgt die [<sup>3</sup>H]-NA-Aufnahme im linearen Bereich (LIANG et al., 1989).

#### 2.6. Kontraktionsmessungen an der Arteria pulmonalis und Aorta thoracica

Die durchgeführten Messungen dienten, neben den Untersuchungen zur  $\beta$ -adrenergen Signaltransduktion am Herzen, der Charakterisierung des  $\alpha_1$ -adrenerg-vermittelten vaskulären Kontraktionsvermögens in Abhängigkeit vom Schweregrad der MCT-induzierten pulmonalen Hypertonie/RHH/RHI.

Bei diesen Experimenten wurde die NA-induzierte Maximalkontraktion von Gefäßpräparationen in Abhängigkeit von der verwendeten Agonistenkonzentration gemessen. (Erstellen einer kumulativen NA-Wirkungskurve im Bereich von  $10^{-10}$  bis  $10^{-5}$  M). Die Untersuchungen erfolgten an der Arteria pulmonalis, welche die lokalen Effekte des MCT im pulmonalen Kreislauf widerspiegelt, sowie an der Aorta thoracica zur Verifizierung systemischer vaskulärer MCT-Effekte.

##### 2.6.1. Gefäßpräparation

Nach zügiger Entnahme der Arteria pulmonalis und Aorta thoracica aus den getöteten Tieren wurden diese in je 5 ml, mit Carbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) begasten, mks-Puffer gegeben. Nach Entfernung des überschüssigen Fett- und Bindegewebes wurden die Pulmonalarterien in 2 mm breite Ringe geschnitten (pro Arterie je zwei Ringe) und die freipräparierten thorakalen Anteile der Aorta in helikale Streifen zu 2 mm Breite und 10 mm Länge geteilt (pro Arterie vier Streifen). Anschließend wurden die so vorbereiteten Arterienproben in ein Organbad gegeben, welches 10 ml frisch oxygenierten mks-Puffer (37 °C, pH 7,4) enthielt und zwischen

zwei Haken gespannt (Föhr-Organbadanlage, Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim, Deutschland).

### 2.6.2. Kontraktionsmessungen

Die Messung der Kontraktionskraft erfolgte isometrisch unter Verwendung eines Kraftwandlers mit integrierter Verstärker- und Registriereinheit (Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim, Deutschland). Die Einstellung der Vorlast erfolgte auf 9,81 mN. Während der sechzigminütigen Equilibrationszeit wurde der Puffer im Organbad alle 20 min ausgewechselt.

Nach Einstellung der Ruhespannung wurde die Kontraktionsfähigkeit der Arterienstreifen durch die Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  Phenylephrin überprüft. Dem folgten 10  $\mu\text{M}$  Carbachol, um die Integrität des Gefäßendothels der Arterienstreifen zu überprüfen. Danach wurden die Präparate wiederholt mit mks-Puffer gewaschen bis die initiale Spannung wiederhergestellt war.

Nach dieser Einstellungsphase wurde die kumulative Konzentration-Wirkungskurve für Noradrenalin ( $\alpha_1$ -AR-Agonist) in den aufsteigenden Konzentrationen von  $10^{-10}$  bis  $10^{-5}$  M (zwölf Konzentrationen im Abstand von 0,5 logarithmischen Einheiten) ermittelt. Dies geschah unter Zugabe von 0,1  $\mu\text{M}$  Propranolol (unspezifischer  $\beta$ -AR-Blocker) und 10  $\mu\text{M}$  Kokain (unspezifischer Monoamin-Transporter-Inhibitor), zum einen zur Unterbindung einer Interaktion von NA mit  $\beta$ -AR und zum anderen, um einer Wirkabschwächung des Agonisten durch die Aufnahme des NA entgegenzuwirken. Jede Konzentrationsstufe wurde bis zur Einstellung des jeweiligen Kontraktionsmaximums gehalten (ca. 5 bis 10 min). Die entwickelte Kontraktionskraft für die jeweilige NA-Konzentration wurde, bezogen auf die durchschnittliche Fläche der verwendeten Gefäße, nach WANSTALL et al. (1991) ausgewertet.

## 2.7. Statistische Auswertung

Die im Text, in den Abbildungen und Tabellen dargestellten Daten sind angegeben als Mittelwerte mit der Standardabweichung des jeweiligen Mittelwertes ( $MW \pm SEM$ ) von [n] Versuchen (= Ratten).

Die Berechnung der Dissoziationskonstante  $K_D$  und der maximalen Anzahl der Bindungen  $B_{max}$  aus den [ $^3H$ ]-Nisoxitin- und  $-(-)[^{125}J]$ -Jodocyanopindolol-Bindungsstudien erfolgte computergestützt über die Darstellung der Messwerte als Sättigungs-Kurve (SCATCHARD, 1949) und deren Analyse mit Hilfe nicht-linearer Regressionsmethoden (GraphPad Software, Inc. San Diego, Kalifornien USA).

Unter Berücksichtigung der spezifischen Radioaktivität von [ $^3H$ ]-Nisoxitin und  $-(-)[^{125}J]$ -Jodocyanopindolol, der Zählrohrbeute der verwendeten Counter für das entsprechende Isotop und des jeweiligen Volumen des Reaktionsansatzes erfolgte die Angabe der berechneten Werte für  $K_D$  in pmol ( $\beta$ -AR) bzw. nmol (NAT) und für  $B_{max}$  in fmol/mg Protein (SCATCHARD, 1949; TEJANI-BUTT, 1992; LEINWEBER et al., 2000, 2002b).

Die Analyse der erhaltenen Werte aus den Verdrängungsexperimenten mit dem Kompetitor CGP 20712A zur  $\beta$ -AR Subtypenbestimmung erfolgte ebenfalls mit Hilfe iterativer, nicht-linearer Kurvenanpassung. Zur Beurteilung des Verlaufs der Verdrängungskurven (mono- bzw. biphasisch) kam der F-Ratio-Test zum Einsatz.

Die Ermittlung der maximalen NA-induzierten Kontraktion  $E_{max}$  in  $mN/mm^2$  und der NA-Konzentration, welche einen halbmaximalen Kontraktionseffekt auslöst ( $pD_2$ ,  $-\log$  mol/l), vollzog sich analog zu den Bindungsstudien mit [ $^3H$ ]-Nisoxitin und  $-(-)[^{125}J]$ -Jodocyanopindolol über die Kurvendarstellung der Messwerte und deren anschließender Analyse unter Einsatz nicht-linearer Regressionsmethoden (GraphPad Software, Inc. San Diego, Kalifornien USA).

Die Signifikanz von Differenzen zwischen den Mittelwerten wurde unter Anwendung des Student's t-Tests für ungepaarte Proben ermittelt. Ein p-Wert  $<0,05$  galt als signifikant. Alle statistischen Berechnungen wurden mit dem PC-Programm GraphPad<sup>TM</sup> Prism<sup>®</sup> 3.00 (GraphPad Software, Inc. San Diego, Kalifornien USA) durchgeführt.

## 2.8. Verwendete Puffer und Lösungen

### Phosphatpuffer I zur Bestimmung der pNA-Konzentration

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	200 mM
EDTA	10 mM
$\text{NaN}_3$	1,71 mM

- Einstellen des pH-Wertes auf 8,7 mit  $\text{NH}_4\text{OH}$ .

### Phosphatpuffer II zur Bestimmung der pNA-Konzentration

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	1000 mM
Oktansulfonsäure	5 mM
$\text{NaN}_3$	1,71 mM

- Einstellen des pH-Wertes auf 3,0 mit  $\text{NH}_4\text{OH}$ .

### Kaliumhydrogencarbonatpuffer ( $\text{KHCO}_3$ ; 1mM) für die Membranpräparation zur Bestimmung der $\beta$ -AR-Dichte und -Subtypverteilung

Dieser Puffer wurde durch Hinzugeben von 200,24 mg Kaliumhydrogencarbonat auf 2 l Aqua dest. hergestellt. Dem sorgfältigen Mischungsvorgang folgte die Lagerung bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C. Eine pH-Wert-Einstellung entfiel bei diesem Puffer.

### Inkubationspuffer/Gebrauchspuffer zur Bestimmung der $\beta$ -AR-Dichte und -Subtypverteilung

Tris	10 mM	Inkubationspuffer
NaCl	154 mM	
Ascorbinsäure	0,55 mM	Gebrauchspuffer

- Einstellen des pH-Wertes auf 7,4 bei Raumtemperatur (25 °C) mit HCl.

Zur Herstellung des Gebrauchspuffers wurde 10 mg Ascorbinsäure in 100 ml Inkubationspuffer gelöst.

Lyse-Puffer zur Bestimmung der GRK-Aktivität

Tris	10 mM
NaCl	5 mM
EDTA	5 mM

- Zugabe von 40 µg/ml Phenylmethylsulfonylfluorid, 40 µg/ml Leupeptin, 40 µg/ml Benzamidin (Protease-Inhibitoren).
- Einstellen des pH-Wertes auf 7,4 mit HCl.
- Puffer wurde bei 4 °C gelagert.

Assay-Puffer zur Bestimmung der GRK-Aktivität

Tris-HCl	10 mM
EDTA	5 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
ATP	0,1 mM
βγ-Untereinheiten	230 pM

und γ-[<sup>32</sup>P]-ATP (20 µCi ≈ 0,08 mmol/l)

Assay-Puffer zur Bestimmung der NAT-Dichte

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM
NaCl	120 mM
KCl	5 mM

- Einstellen des pH-Wertes auf 7,4 mit NaOH.
- Puffer wurde bei 4 °C gelagert.

Saccharose-Assay-Puffer zur Bestimmung der NAT-Dichte

Der 0,25 molare Saccharose-Puffer wurde durch Hinzufügen von 8,56 g Saccharose auf 100 ml Assay-Puffer für jeden Bindungsversuch frisch hergestellt, auf Eis gelagert und am Ende eines jeden Versuchstages verworfen.

modified-Krebs-Henseleit-solution (mks) zur Bestimmung der NAT-Aktivität

NaCl	118 mM
KCl	4,7 mM
CaCl <sub>2</sub>	2,5 mM
MgCl <sub>2</sub>	0,54 mM
NaHCO <sub>3</sub>	25 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 mM
Glucose	11 mM
EDTA	0,094 mM
Ascorbinsäure	1,14 mM

- 0,067 mM Nialamid (MAO-Hemmer, 3,5 mg/300ml mks Puffer) frisch vor Versuch hinzugeben.
- Puffer mindestens 30 min vor Gebrauch bei 4 °C (auf Eis) mit Carbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) zur Einstellung des pH-Wertes begast.

modified-Krebs-Henseleit-solution (mks) zur Bestimmung der NA-induzierten  
Gefäßkontraktion

NaCl	119 mM
KCl	4,75 mM
CaCl <sub>2</sub>	2,25 mM
MgSO <sub>4</sub>	1,19 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 mM
NaHCO <sub>3</sub>	25 mM
Glucose	10 mM
EDTA	0,03 mM
Ascorbinsäure	0,12 mM

- Puffer mindestens 30 min vor Gebrauch bei 37 °C mit Carbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) zur Einstellung des pH-Wertes begast.

## 2.9. Herstellernachweis der verwendeten Substanzen

Ascorbinsäure (1)

βγ-Untereinheit (7)

Calciumchlorid (1)

Carbachol (4)

CGP 20712A (1-[2-((3-carbamoyl-4-hydroxy)phenoxy)ethylamino]-3-[4-(1-methyl-4-trifluoromethylimidazolyl)-phenoxy]-2-propanol) (6)

(±)-CGP 12177 Hydrochlorid(4-[3-tertiarbutylamino-2-hydroxypropoxyl]-benzimidazol-2-on) (6)

Coomassie G-250 (9)

Corticosteron (4)

Desipramin (8)

D,L-[7-<sup>3</sup>H(N)]-Nordrenalin-Hydrochlorid (5)  
EDTA-dinatrium-diphosphat (1)  
D-Glucose (1)  
Gluthation (1)  
Heparin (3)  
-(-)[<sup>125</sup>J]-Jodocyanopindolol (5)  
Kaliumchlorid (1)  
Kaliumdihydrogenphosphat (1)  
Kaliumhydrogencarbonat (1)  
Kokain (4)  
LiChrosphor 100 RP 18ec (1)  
Magnesiumchlorid (1)  
Magnesiumsulfat (1)  
Methanol (1)  
Monocrotalin (4)  
Natriumchlorid (1)  
Natriumdihydrogenphosphat (1)  
Natriumhydrogenkarbonat (1)  
Natriumhydrogenphosphat (1)  
Nialamid (4)  
[N-methyl-<sup>3</sup>H]-Nisoxitin-Hydrochlorid (5)  
(-)-Noradrenalin-Bitrat (4)  
 $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP (5)  
Pentobarbital (4)  
Phenylephrin (4)  
Propranolol (4)  
Rhodopsin (7)  
Saccharose (1)  
Sodium-doderyl-sulfat (4)



Szintillationslösung Lumasafe™ plus (2)  
 Tris-[hydroxymethyl]-methylamin Hydrochlorid (4)  
 Trichloressigsäure (1)  
 Vinyl-Copolymer mit Phenylboronsäure (1)

- (1) Merck GmbH, Darmstadt; Deutschland  
 (2) Lumec LSC BV, Groningen; Niederlande  
 (3) Biochrom KG, Berlin; Deutschland  
 (4) Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen; Deutschland  
 (5) Perkin-Elmer Life Sciences, Köln; Deutschland  
 (6) Ciba-Geigy, Basel; Schweiz  
 (7) Prof. Dr. M.J. Lohse; Universität Würzburg; Deutschland  
 (8) Research Biochemicals International, Naatick; USA  
 (9) Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien; USA

## 2.10. Verwendete Geräte und Einmalartikel

<u>Gerät</u>	<u>Hersteller</u>
Auto-Gamma Cobra™ II	Canberra-Packard, Meriden; USA
Bio-Imaging Analyzer BAS 2000	Raytest Isotopenmessgeräte, Straubenhardt; Deutschland
Harvester	Brandel Biomedical Research and Development Lab. Inc., Gaithersburg; USA
Hellige Rekorder	Hellige GmbH, Freiburg; Deutschland
Organbad-Anlage	Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim; Deutschland
Liquid Szintillation Analyzer Nr.2250CA	Packard Instrument Company, Meriden; USA
McIlwain Tissue-Chopper	Bachhofer, Reutlingen; Deutschland
Millipore-Vakuumfiltrationstopf	Millipore GmbH, Eschborn; Deutschland

Röntgenfilme	Fuji Photo Film Co. LTD, Japan
Spektrophotometer DU <sup>®</sup> 520	Beckman Instruments, Inc., Fullerton; USA
Stimulator II	Hugo Sachs, March-Hugstetten; Deutschland
Ultra-Turrax T25	IKA Labortechnik GmbH & Co-KG, Staufen; Deutschland

**Zentrifugen:**

Sorvall <sup>®</sup> RC-5B Refrigerated	Superspeed Centrifuge DuPont Company, Newtown; USA
Biofuge fresco	Kendro, Osterode; Deutschland

Einmalartikel

Hersteller

Counterröhrchen	Greiner Labortechnik, Frickenhausen; Deutschland
Glasfilter	Whatman GF/C Whatman, Inc., Clifton, NJ; USA
Filmplatten	Kodak, Biomax MS-1, Sigma, Deisenhofen; Deutschland
Scintillatorgefäße	Greiner Labortechnik, Frickenhausen; Deutschland

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Charakterisierung des Tiermodells

##### 3.1.1. Futteraufnahme, Körper- und Organgewichte

Die MCT-behandelten Tiere zeigten vor allem im Zeitraum unmittelbar nach der Injektion des Pyrrolizidin-Alkaloids infolge einer geringeren Futteraufnahme eine geringere Gewichtszunahme als die mit Kochsalzlösung-behandelten Ratten. Um dieser Entwicklung entgegenzuwirken, hatten die MCT-Ratten freien Zugriff auf das Futter und die Kontrolltiere bekamen die Menge an Futter, welches durch Rückwaage des verzehrten Futters der MCT-Ratten vom Vortag ermittelt wurde. Bereits im zweiten Zeitintervall (13-19 d nach MCT-Applikation) zeigten die ersten Tiere Symptome eines pulmonalen Hochdrucks wie Dys- und Tachypnoe. Zwischen dem 21.-28. Tag nach MCT-Gabe kam es dann zur Ausbildung einer manifesten RHI mit deutlichen kardiopulmonalen Beschwerden und typischen Stauungszeichen (Pleura- und Perikardergüsse, Aszitis, Hepatosplenomegalie und Zyanose).

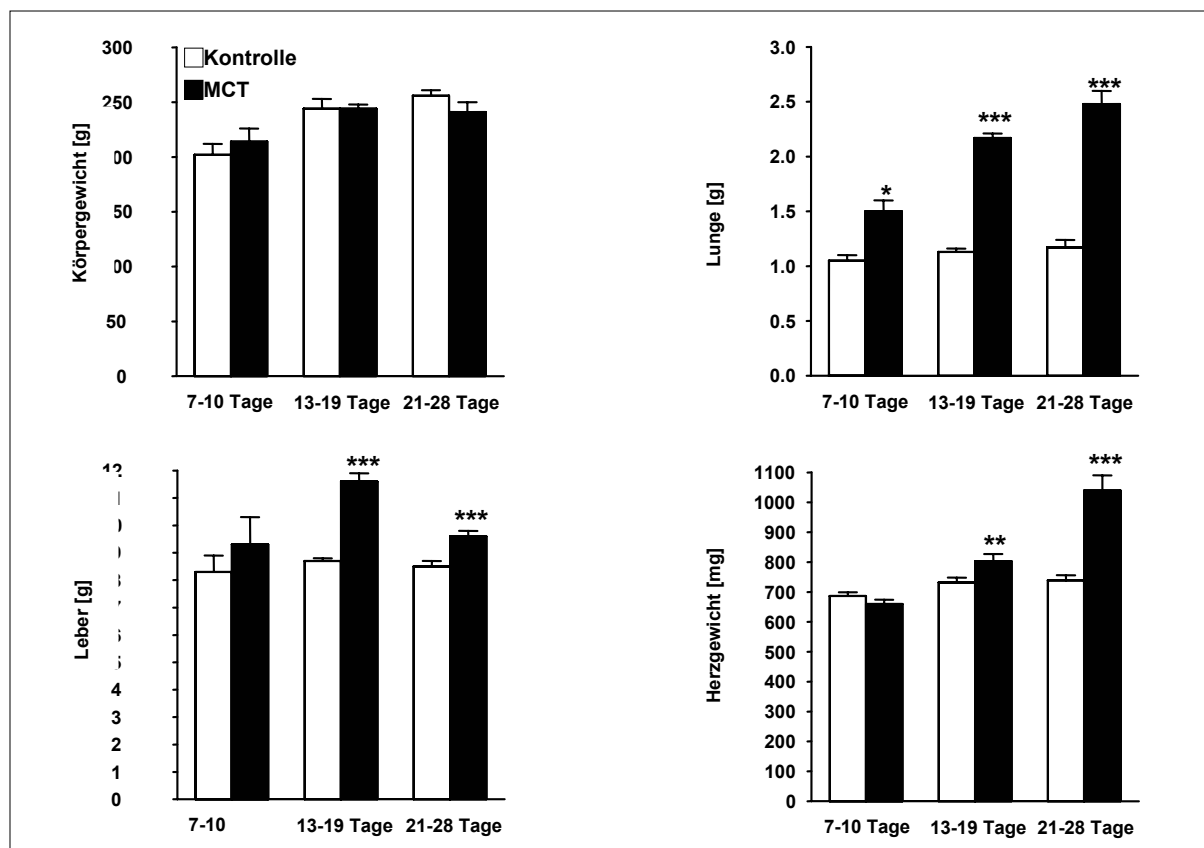


Abbildung 3.1.: Körper- und Organgewichte 7-10, 13-19, und 21-28 Tage nach MCT-Applikation; Werte angegeben als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von 7-20 Ratten mit \*)  $p < 0,05$ , \*\*)  $p < 0,01$  und \*\*\*)  $p < 0,001$  vs. Kontrollen.

Die durch die MCT-Behandlung ausgelösten Effekte an den Körper- und Organgewichten bei den Ratten aller drei Behandlungszeiträume (Gruppe I: 7-10 d, Gruppe II: 13-19 d und Gruppe III: 21-28 d nach MCT-Applikation) gegenüber ihren entsprechenden Kontrollgruppen sind in Abbildung 8 dargestellt.

In allen drei Zeiträumen konnte, durch die Futterrestriktion bei den Kontrollen, kein signifikanter Unterschied beim Körpergewicht zwischen den MCT-behandelten und den mit Kochsalzlösung-behandelten Versuchstieren festgestellt werden. Jedoch wiesen die MCT-behandelten Tiere der Gruppe II und III eine signifikante Zunahme in den Lungen- und Lebergewichten im Vergleich zu den entsprechenden Kontrolltieren auf.

Die Analyse der Herzgewichte zeigte keine Zunahme in Gruppe I, einen leichten Anstieg in Gruppe II ( $p < 0,01$ ) und eine signifikante Zunahme in Gruppe III ( $p < 0,001$ ) der MCT-behandelten Tiere im Vergleich mit ihren Kontrollen.

Eine eingehende Betrachtung der Ventrikelgewichte zeigt, dass sich im Zeitintervall I das rechtsventrikuläre Gewicht der MCT-behandelten Tiere nicht veränderte, in Gruppe II um mehr als das 1,5fache zunahm und in Gruppe III sogar mehr als das 2fache betrug, verglichen mit den Kontroll-Tieren (Abbildung 9). Demgegenüber ließen sich in allen drei Zeitintervallen nur minimale Veränderungen der linksventrikulären Gewichte zwischen den mit MCT- und Kochsalzlösung-behandelten Ratten erkennen.

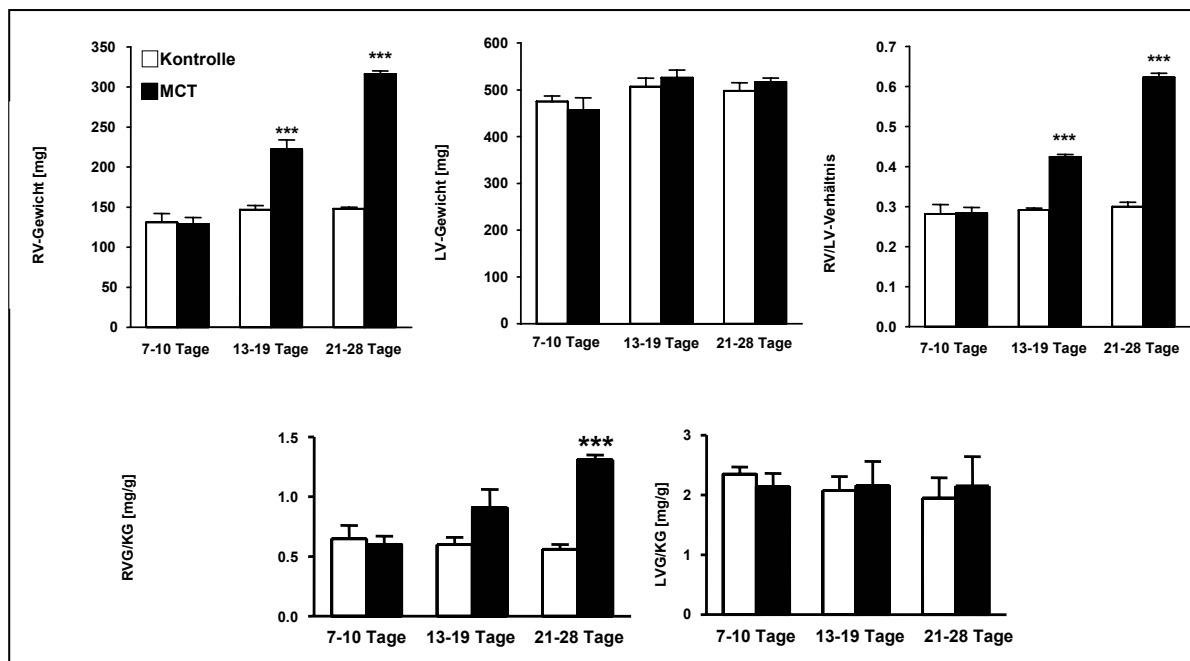


Abbildung 9: Ventrikelgewichte und -verhältnisse 7-10, 13-19 und 21-28 Tage nach MCT-Applikation; Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von 10-18 Ratten mit (\*\*\*)  $p < 0,001$  vs. Kontrollen.

Somit stieg der berechnete Quotient aus RVG/KG, als Index für die rechtsventrikuläre Hypertrophie, in Gruppe II an (jedoch noch nicht signifikant) und nahm gegenüber den Kontrollen in Gruppe III sogar signifikant zu ( $p < 0,001$ ).

Der RVG/LVSG Quotient, als ein vom Körpergewicht unabhängiger Index für die rechtsventrikuläre Hypertrophie war in den Zeitintervallen II und III signifikant im Vergleich zu den gleichaltrigen mit Kochsalzlösung-behandelten Versuchstieren erhöht. Bei den MCT-Ratten der Gruppe II lag er um das 1,4fache und bei den MCT-behandelten Tieren der Gruppe III sogar um mehr als das 2fache über den jeweiligen Werten der Kontrolltiere.

	7-10 d nach Applikation Hypertrophie-Vorstadium		13-19 d nach Applikation leichte/milde RHH		21-28 d nach Applikation schwerwiegende RHH bzw. RHI	
	Kontrolle [n]	MCT [n]	Kontrolle [n]	MCT [n]	Kontrolle [n]	MCT [n]
<b>Körpergewicht (g)</b>	202±5 [10]	186±6 [10]	244±9 [12]	244±4 [18]	256±5 [15]	241±9 [14]
<b>Herz (mg)</b>	555±20 [10]	532±35 [10]	687±16 [12]	803±24 [18]**	739±17 [15]	959±15 [16]***
<b>RVG (mg)</b>	118±3 [10]	118±4 [10]	147±5 [12]	222±6 [18]***	148±2 [15]	316±4 [16]***
<b>LVSG (mg)</b>	434±21 [10]	394±19 [10]	507±18 [12]	526±16 [18]	498±17 [15]	517±8 [16]
<b>RVG/KG (mg/g)</b>	0,59±0,02 [10]	0,61±0,02 [10]	0,60±0,06 [10]	0,91±0,15 [12]	0,56±0,05 [10]	1,31±0,04 [12]***
<b>RVG/LVSG</b>	0,28±0,01 [10]	0,30±0,23 [10]	0,29±0,01 [12]	0,42±0,01 [18]***	0,3±0,01 [15]	0,61±0,01 [16]***
<b>Lunge (g)</b>	1,05±0,05 [10]	1,5±0,1 [10]	1,1±0,03 [12]	2,2±0,04 [18]***	1,2±0,1 [15]	2,5±0,1 [20]***
<b>Leber (g)</b>	8,3±0,6 [9]	9,3±1,0 [10]	8,7±0,1 [12]	11,6±0,3 [18]***	8,5±0,2 [15]	9,6±0,2 [16]***
<b>Alter (d)</b>	8,1±0,23	8,1±0,23	15,5±0,31	15,5±0,31	22,0±0,39	22,0±0,39

Tabelle 2: Körper- und Organgewichte 7-10, 13-19, und 21-28 Tage nach MCT-Applikation; Werte angegeben als Mittelwerte ± S.E.M. von 7-20 Ratten mit \*) p<0,05, \*\*) p<0,01 und \*\*\*) p<0,001 vs. Kontrollen.

### 3.1.2. Plasma-Noradrenalin-Konzentration

In den Gruppen I und II konnten keine signifikanten Veränderungen der pNA-Spiegel in MCT-behandelten Ratten im Vergleich zu den Kontrolltieren festgestellt werden. Dagegen nahm in Gruppe III die pNA-Konzentration der MCT-behandelten Tiere gegenüber den gleichaltrigen Kontrollen signifikant um mehr als das 2fache zu (Kontrolle:  $278 \pm 18$  vs. MCT:  $645 \pm 63$  pg/ml;  $p < 0,001$ ; Abbildung 10). Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass das Stadium der schwerwiegenden RHH bzw. RHI mit einem signifikanten Anstieg der pNA-Konzentration einhergeht.

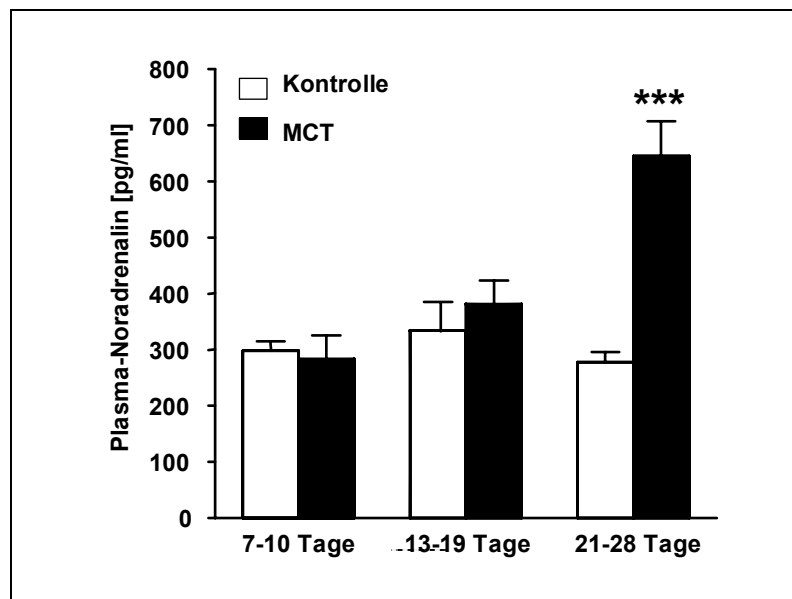


Abbildung 10: pNA-Gehalt in pg Noradrenalin per ml Plasma 7-10 [n=9/8], 13-19 [n=10/9] und 21-28 [n=12/12] Tage nach MCT-Applikation. Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von [n/n] Ratten mit \*\*\*  $p < 0,001$  vs. Kontrollen.

### 3.2. Bindungseigenschaften kardialer $\beta$ -Adrenozeptoren

Bei den MCT-behandelten Tieren der Gruppe I war die totale rechtsventrikuläre  $\beta$ -AR-Dichte signifikant im Vergleich zu den mit Kochsalzlösung-behandelten Tieren erniedrigt. Die linksventrikuläre  $\beta$ -AR-Dichte war hingegen nicht verändert. Das kardiale  $\beta_1:\beta_2$  AR-Verhältnis in dieser Zeitgruppe blieb in beiden Ventrikeln unverändert (Tabelle 3a).

		RV		LV	
		Kontrolle	MCT	Kontrolle	MCT
Gruppe I	$B_{\max}$	27,7±2,9 [7]	18,9±2,4 [7]***	28,6±4,0 [7]	24,9±1,9 [7]
	$K_D$	20,3±4,7 [7]	18,3±0,7 [7]	21,4±3,5 [7]	21,1±3,2 [7]
	$\beta_1:\beta_2$ -AR	75±2,4:25±2,4 [6]	76±2:24±2 [6]	73±2,7:27±2,7 [6]	74±1,8:26±1,8 [6]

Tabelle 3a:  $\beta$ -AR-Dichte  $B_{\max}$  (fmol/mg Protein), Dissoziationskonstante  $K_D$  (pmol) des Radioliganden  $(-)[^{125}\text{J}]\text{-Jodocyanopindolol}$ ,  $\beta_1:\beta_2$ -AR-Verhältnis (%) in rechts- und linksventrikulären Rohmembransuspensionen (RV und LV) von MCT-behandelten Ratten und ihren Kontrollen 7-10 d (Gruppe I) nach Applikation. Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM von [n] Versuchen. \*)  $p < 0,05$  und \*\*\*)  $p < 0,001$  vs. Kontrollen.

Im Zeitintervall II war sowohl die rechts- als auch die linksventrikuläre  $\beta$ -AR-Dichte der MCT-Ratten im Vergleich mit ihren Kontrollen nicht verändert (Tabelle 3b).

Mit zunehmender Entwicklung der rechtsventrikulären Hypertrophie in diesem Zeitintervall konnte jedoch ein signifikanter Shift des  $\beta_1:\beta_2$  AR-Verhältnisses im rechten Ventrikel von 73:27% bei den mit Kochsalzlösung-behandelten Tieren zu 55:45% bei den MCT-Tieren beobachtet werden. Diese Verschiebung resultierte aus einer Abnahme der rechtsventrikulären  $\beta_1$ -AR-Dichte von 19,6±1,2 auf 12,9±0,9 fmol/mg Protein ( $p < 0,05$ ) und einem Anstieg der  $\beta_2$ -AR-Dichte von 7,5±0,8 auf 10,4±1,0 fmol/mg Protein ( $p < 0,05$ ). Das linksventrikuläre  $\beta_1:\beta_2$  AR-Verhältnis blieb bei Gruppe II unverändert.

		RV		LV	
		Kontrolle	MCT	Kontrolle	MCT
Gruppe II	$B_{\max}$	27,0±1,9 [10]	23,6±2,3 [13]	30,9±1,2 [10]	31,5±1,7 [13]
	$K_D$	27±1,6 [10]	23±2,2 [13]	23±1,9 [10]	22±3,1 [13]
	$\beta_1:\beta_2$ -AR	73±1:27±1 [6]	55±3:45±3 [7]***	73±1,4:27±1,4 [6]	74±1,4:26±1,4 [7]

Tabelle 3b:  $\beta$ -AR-Dichte  $B_{\max}$  (fmol/mg Protein), Dissoziationskonstante  $K_D$  (pmol) des Radioliganden  $(-)[^{125}\text{J}]\text{-Jodocyanopindolol}$ ,  $\beta_1:\beta_2$ -AR-Verhältnis (%) in rechts- und linksventrikulären Rohmembransuspensionen (RV und LV) von MCT-behandelten Ratten und ihren Kontrollen 13-19 d (Gruppe II) nach Applikation. Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM von [n] Versuchen. \*)  $p < 0,05$  und \*\*\*)  $p < 0,001$  vs. Kontrollen.

Im Zeitintervall III nahm die totale rechtsventrikuläre  $\beta$ -AR-Dichte über 50% bei den MCT-behandelten Tieren im Vergleich mit den Kontroll-Tieren ab (Tabelle 3c). In dieser Gruppe lag ebenfalls eine signifikante Verschiebung im rechtsventrikulären  $\beta_1:\beta_2$  AR-Verhältnis von 75:25% bei den mit Kochsalzlösung-behandelten Tieren zu 54:46% bei den MCT-Ratten vor. Dieser Zustand resultierte aus einer signifikanten Abnahme der rechtsventrikulären  $\beta_1$ -AR-



Dichte von  $19,8 \pm 1,1$  auf  $6,9 \pm 0,9$  fmol/mg Protein ( $p < 0,05$ ) wohingegen sich bei der  $\beta_2$ -AR-Dichte, im Unterschied zum Zeitintervall II, keine Veränderung darstellte ( $6,6 \pm 0,8$  vs.  $5,8 \pm 0,9$  fmol/mg Protein). Darüber hinaus zeigte sich sogar eine signifikante Reduktion der totalen linksventrikulären  $\beta$ -AR-Dichte bei den MCT-Tieren um 23% ( $p < 0,05$ ) im Vergleich mit den Kontroll-Ratten in dieser Gruppe. Das linksventrikuläre  $\beta_1:\beta_2$  AR-Verhältnis verschob sich ebenfalls geringfügig, jedoch noch nicht signifikant von 72:28% bei den Kontrollen auf 66:34% bei den MCT-Ratten (Tabelle 3c). Dieser Effekt resultierte aus einer signifikante Reduktion der linksventrikulären  $\beta_1$ -AR-Dichte von  $20,7 \pm 1,2$  auf  $14,7 \pm 0,7$  fmol/mg Protein ( $p < 0,05$ ), wohingegen die  $\beta_2$ -AR-Dichte mit  $8,1 \pm 0,6$  vs.  $7,6 \pm 0,8$  fmol/mg Protein nahezu unverändert blieb.

Bei den berechneten  $K_D$  Werten der links- und rechtsventrikulären Membranen waren in allen drei Zeitintervallen keine Unterschiede zwischen den MCT-Tieren und den Kontrollen festzustellen (Tabelle 3c).

		RV		LV	
		Kontrolle	MCT	Kontrolle	MCT
Gruppe III	$B_{max}$	$26,5 \pm 1,1$ [15]	$13,4 \pm 1,3$ [15]***	$28,8 \pm 1,9$ [15]	$22,3 \pm 1,5$ [15]*
	$K_D$	$27 \pm 1,1$ [15]	$21 \pm 3,0$ [15]	$29 \pm 1,9$ [15]	$29 \pm 2,6$ [15]
	$\beta_1:\beta_2$ -AR	<b>75</b> $\pm 1,4$ : <b>25</b> $\pm 1,4$ [5]	<b>54</b> $\pm 3$ : <b>46</b> $\pm 3$ [6]***	<b>72</b> $\pm 2,2$ : <b>28</b> $\pm 2,2$ [5]	<b>66</b> $\pm 3,8$ : <b>34</b> $\pm 3,8$ [6]

**Tabelle 3c:  $\beta$ -AR-Dichte  $B_{max}$  (fmol/mg Protein), Dissoziationskonstante  $K_D$  (pmol) des Radioliganden  $(-)[^{125}J]$ -Jodocyanopindolol,  $\beta_1:\beta_2$ -AR-Verhältnis (%) in rechts- und linksventrikulären Rohmembransuspensionen (RV und LV) von MCT-behandelten Ratten und ihren Kontrollen 21-28 d (Gruppe III) nach Applikation. Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SEM von [n] Versuchen. \*)  $p < 0,05$  und \*\*\*)  $p < 0,001$  vs. Kontrollen.**

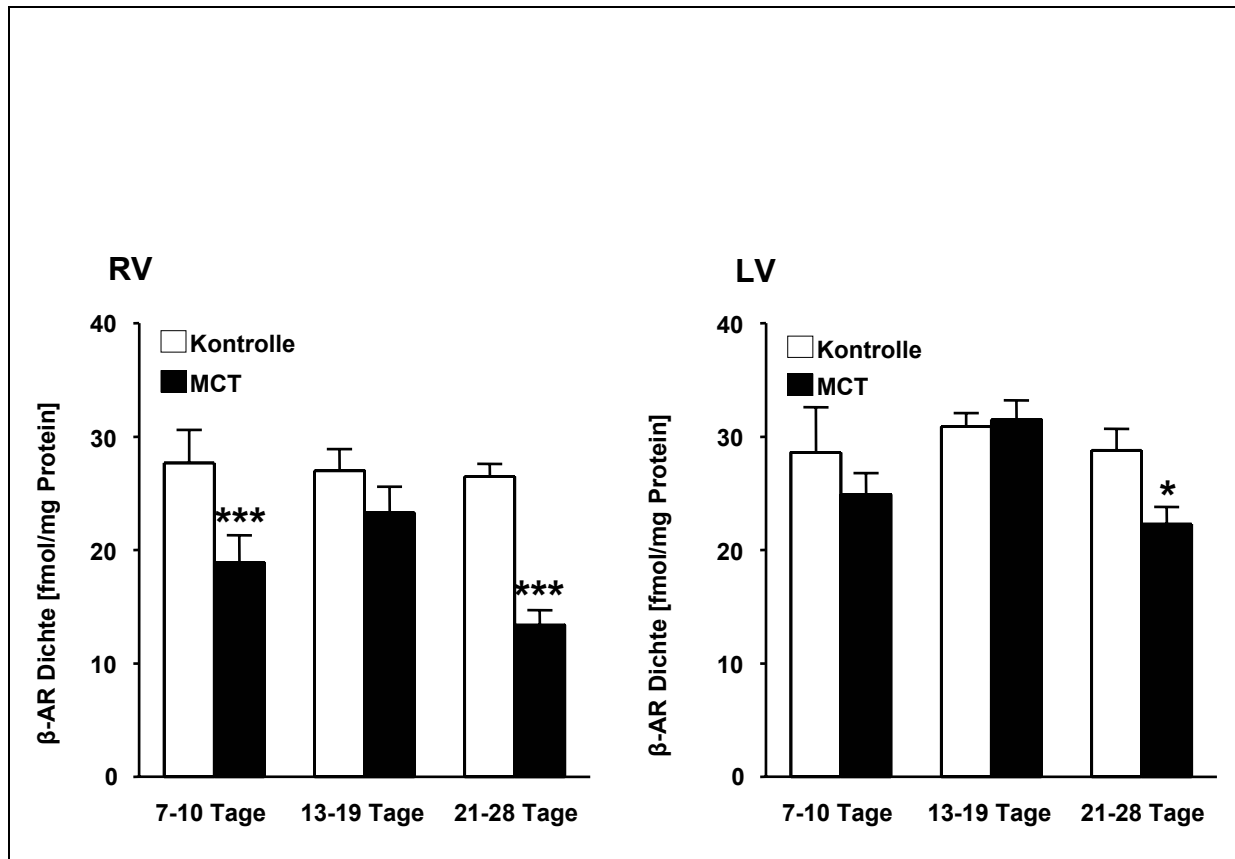
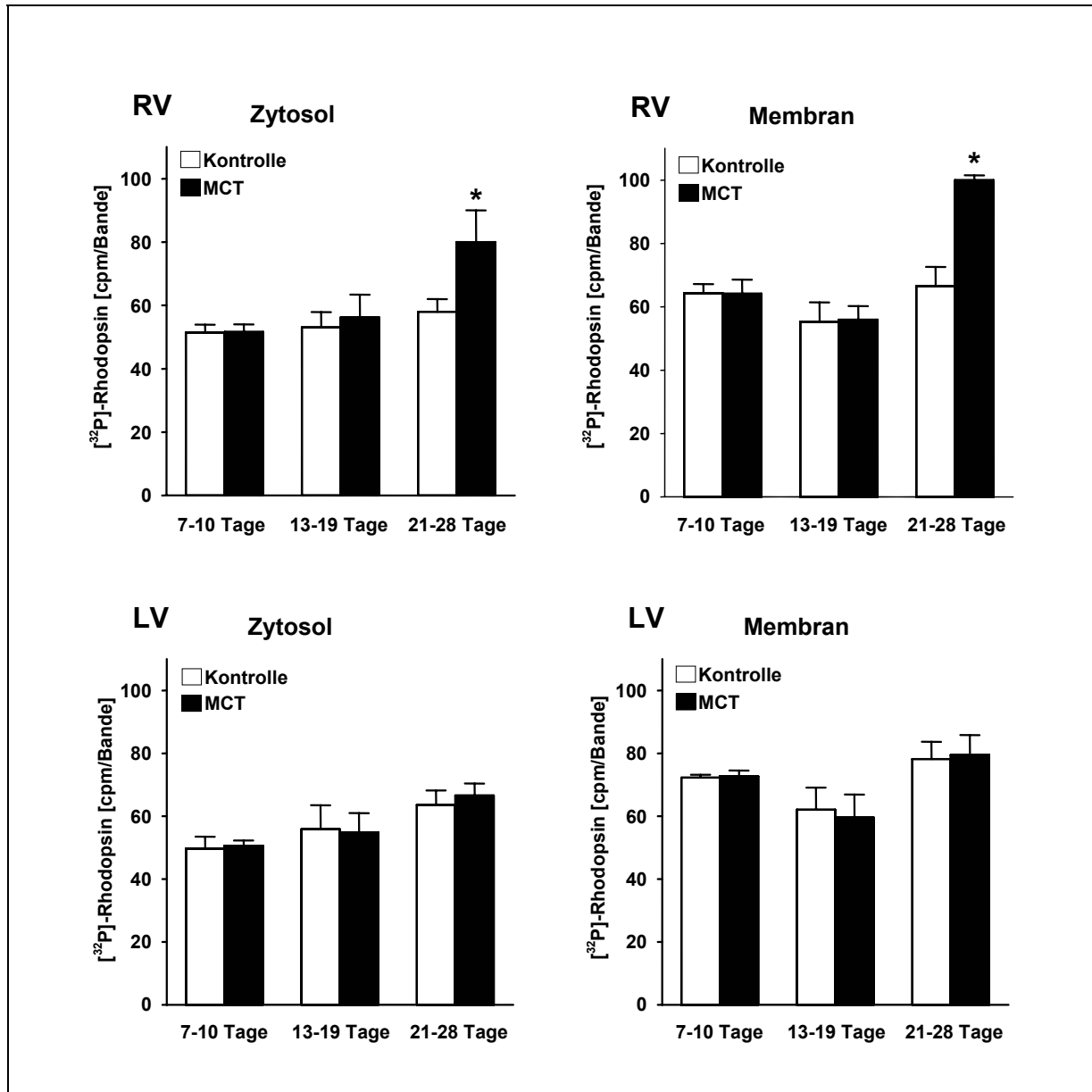


Abbildung 11: Rechts- (RV) und linksventrikuläre (LV)  $\beta$ -AR-Dichte ( $B_{max}$ ) 7-10 [n=12/10], 13-19 [n=10/13] und 21-28 [n=15/15] Tage nach MCT-Applikation. Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von [n/n] Experimenten mit \*)  $p < 0,05$  und \*\*\*)  $p < 0,001$  vs. Kontrollen.

### 3.3. Bestimmung der GRK-Aktivität im ventrikulären Gewebe

Die Ergebnisse aus der Bestimmung der GRK-Aktivität der mit MCT- und Kochsalzlösung-behandelten Tiere von allen drei Zeitintervallen sind in Abbildung 12 zusammengefasst. Bei den Tieren der Zeitgruppe I und II war sowohl die zytosolische als auch die membran-assoziierte rechtsventrikuläre GRK-Aktivität der MCT-behandelten Tiere im Vergleich mit ihren Kontrollen unverändert (KOzyt I:  $51,4 \pm 2,5$  vs. MCTzyt I:  $51,6 \pm 2,4$ ; KOMem I:  $64,3 \pm 2,9$  vs. MCTmem I:  $64,2 \pm 4,4$ ; KOzyt II:  $53,1 \pm 4,8$  vs. MCTzyt II:  $56,2 \pm 7,2$ ; KOMem II:  $55,3 \pm 6,1$  vs. MCTmem II:  $55,9 \pm 4,3$  [ $^{32}$ P]-Rhodopsin [cpm/Bande]). Demgegenüber war die rechtsventrikuläre GRK-Aktivität in den MCT-Ratten der Gruppe III signifikant erhöht. Die Zunahme betrug bei der zytosolischen Fraktion über 28% und bei dem membran-assoziierten Anteil über 34% verglichen mit den Kontroll-Tieren (KOzyt III:  $58,0 \pm 4,0$  vs. MCTzyt III:  $80,0 \pm 10,0$ ; KOMem III:  $66,6 \pm 6,0$  vs. MCTmem III:  $100,0 \pm 1,5$  [ $^{32}$ P]-Rhodopsin [cpm/Bande]). Die linksventrikuläre GRK-Aktivität war in allen drei Zeitintervallen verglichen mit den Kontrollen unverändert (KOzyt I:  $49,7 \pm 3,8$  vs. MCTzyt I:  $50,6 \pm 1,7$

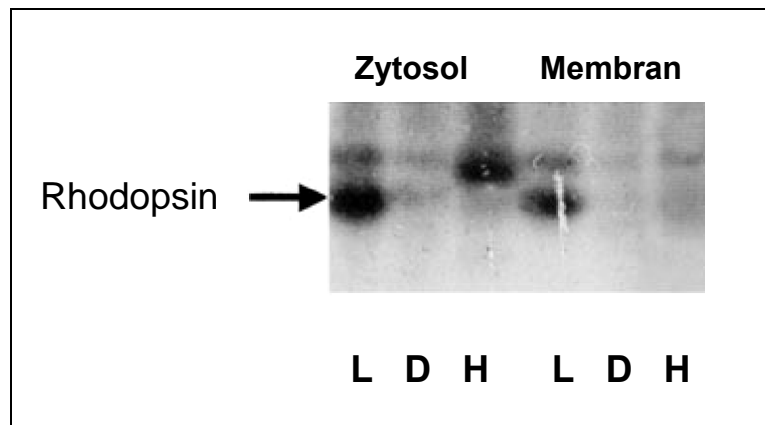
KOmem I:  $72,3 \pm 0,9$  vs. MCTmem I:  $72,2 \pm 1,8$ ; KOzyt II:  $55,9 \pm 7,6$  vs. MCTzyt II:  $54,9 \pm 6,1$ ; KOmem II:  $62,1 \pm 7,0$  vs. MCTmem II:  $59,6 \pm 7,3$ ; KOzyt III:  $63,6 \pm 4,6$  vs. MCTzyt III:  $66,6 \pm 3,8$ ; KOmem III:  $78,2 \pm 5,5$  vs. MCTmem III:  $79,5 \pm 6,3$  [ $^{32}\text{P}$ ]-Rhodopsin [cpm/Bande]; Abbildung 12).



**Abbildung 12: Lichtabhängige Rhodopsin-Phosphorylierung durch G-Protein-gekoppelte Rezeptor Kinase (GRK-Aktivität) in Zytosol- und Membranfraktionen rechter (RV) und linker Ventrikel (LV) 7-10 [n=6/6], 13-19 [n=12/12] und 21-28 [n=12/12] Tage nach MCT- bzw. Kochsalzlösung-Applikation. Mittelwert  $\pm$  S.E.M. von [n/n] Experimenten mit \*)  $p < 0,05$  vs. Kontrollen.**

In ergänzenden Experimenten wurden Zytosol- und Membranfraktionen aus linksventrikulärem Gewebe von mit Kochsalzlösung-behandelten Tieren verwendet und die Enzymaktivität bei Dunkelheit (GRK nicht in der Lage Rhodopsin zu phosphorylieren), in

Gegenwart von Licht sowie lichtabhängig unter Zugabe von 1 mmol/l Heparin, einem spezifischen Inhibitor der GRK2-Aktivität, ermittelt. Diese Experimente dienten der spezifischen GRK2-vermittelten Rhodopsin-Phosphorylierung. Wie in Abbildung 13 dargestellt, zeigte sich sowohl bei Dunkelheit als auch bei Durchführung der Experimente in Gegenwart von Licht + Zugabe von 1 mmol/l Heparin eine deutliche Abnahme an phosphoryliertem Rhodopsin.



**Abbildung 13: Gelelektrophoretische Darstellung der Rhodopsin-Phosphorylierung durch die GRK in Zytosol- und Membranfraktionen aus linksventrikulären Gewebe gewonnen aus mit Kochsalzlösung-behandelter Ratten bei Gegenwart von Licht (L), bei Dunkelheit (D) und bei Gegenwart von Licht + 1 mmol/l Heparin (H). Der Pfeil zeigt auf die Rhodopsinbanden (ROS) mit einem molekularem Gewicht von ~35 kDa**

### 3.4. Untersuchungen zum Noradrenalin-Transporter

#### 3.4.1. Messung der Noradrenalin-Transporter-Dichte

In den ersten beiden Zeitintervallen I und II war die links- und rechtsventrikuläre NAT-Dichte ( $B_{\max}$  = maximale Anzahl der Bindungen) der MCT-behandelten Tiere nicht signifikant gegenüber den Kontroll-Ratten verändert. Es konnte jedoch eine signifikante Reduktion der rechtsventrikulären NAT-Dichte MCT-behandelter Ratten der Gruppe III im Vergleich mit den altersentsprechenden Kontrolltieren beobachtet werden. Die linksventrikuläre NAT-Dichte blieb dagegen in allen drei Zeitintervallen nahezu unverändert (Tabelle 4).

		RV		LV	
		Kontrolle	MCT	Kontrolle	MCT
Gruppe I	$B_{\max}$	86,0±8,4 [4]	92,5±11,6 [4]	94,2±11,9 [4]	81,7±14,3 [4]
	$K_D$	362,6±28,7 [4]	400,9±77,2 [4]	423,5±65,7 [4]	278,5±45,2 [4]
Gruppe II	$B_{\max}$	85,9±5,5 [4]	74,3 ±3,5 [4]	73,3±3,9 [4]	82,9±3,4 [4]
	$K_D$	442,2±119,3 [4]	609,9±251,6 [4]	325,2±44,2 [4]	352,7±134,4 [4]
Gruppe III	$B_{\max}$	79,6±2,9 [5]	51,0±11,3 [5]*	86,3±5,6 [5]	80,9±12,8 [5]
	$K_D$	288,5±53,8 [5]	569,2±115,9 [5]	519,04±125,8 [5]	901,2±267,7 [5]

Tabelle 4: Maximale Bindung  $B_{\max}$  (fmol/mg Protein) und Dissoziationskonstante  $K_D$  (pmol/l) des Radioliganden [ $^3$ H]-Nisoxitin an rechts- (RV) und linksventrikulären (LV) Rohmembransuspensionen von MCT-behandelten Ratten und ihren Kontrollen 7-10 d (Gruppe I), 13-19 d (Gruppe II) und 21-28 d (Gruppe III) nach Applikation. Werte sind angegeben als Mittelwerte ± S.E.M. von [n] Versuchen mit \*)  $p < 0,05$  vs. Kontrollen.

Des Weiteren war, weder in den linken noch in den rechten Ventrikeln, in keinem der drei Zeitintervalle ein signifikanter Unterschied zwischen den  $K_D$ -Werten bei den MCT- und Kontroll-Ratten zu beobachten (Tabelle 4).

### 3.4.2. Bestimmung der Noradrenalin-Transporter-Aktivität

Die ventrikelspezifische NAT-Aktivität der MCT- und Kochsalzlösung-behandelten Versuchstiere stand in direkter Beziehung zu den verwendeten Konzentrationen von [ $^3\text{H}$ ]-Noradrenalin (1-25 nmol/l).

Analog zu den ermittelten Ergebnissen zur Bestimmung der NAT-Dichte konnten in den Gruppen I und II keine signifikanten Veränderungen der NAT-Aktivität sowohl in den rechten (KO I:  $145,97 \pm 14,02$  vs. MCT I:  $124,91 \pm 13,56$ ; KO II:  $135,48 \pm 13,55$  vs. MCT II:  $112,76 \pm 5,82$  pmol [ $^3\text{H}$ ]-Noradrenalin/mg Gewebe/15 min) als auch in den linken Ventrikeln (KO I:  $126,38 \pm 10,20$  vs. MCT I:  $116,53 \pm 8,57$ ; KO II:  $112,21 \pm 10,26$  vs. MCT II:  $116,98 \pm 8,61$  pmol [ $^3\text{H}$ ]-Noradrenalin/mg Gewebe/15 min) der MCT-behandelten Ratten im Vergleich zu den Kontroll-Tieren nachgewiesen werden (Abbildung 14a und 14b). Es zeigte sich jedoch im Zeitintervall III eine signifikante Abnahme der rechtsventrikulären NAT-Aktivität von über 42% (KO:  $111,8 \pm 15,9$  vs. MCT:  $65,4 \pm 7,4$  pmol [ $^3\text{H}$ ]-Noradrenalin/mg Gewebe/15 min) bei den mit MCT-behandelten Ratten im Vergleich zu ihren Kontrollen ohne signifikante Veränderungen linksventrikulär (KO:  $99,62 \pm 4,13$  vs. MCT:  $103,85 \pm 7,24$  pmol [ $^3\text{H}$ ]-Noradrenalin/mg Gewebe/15 min; Abbildung 14c).

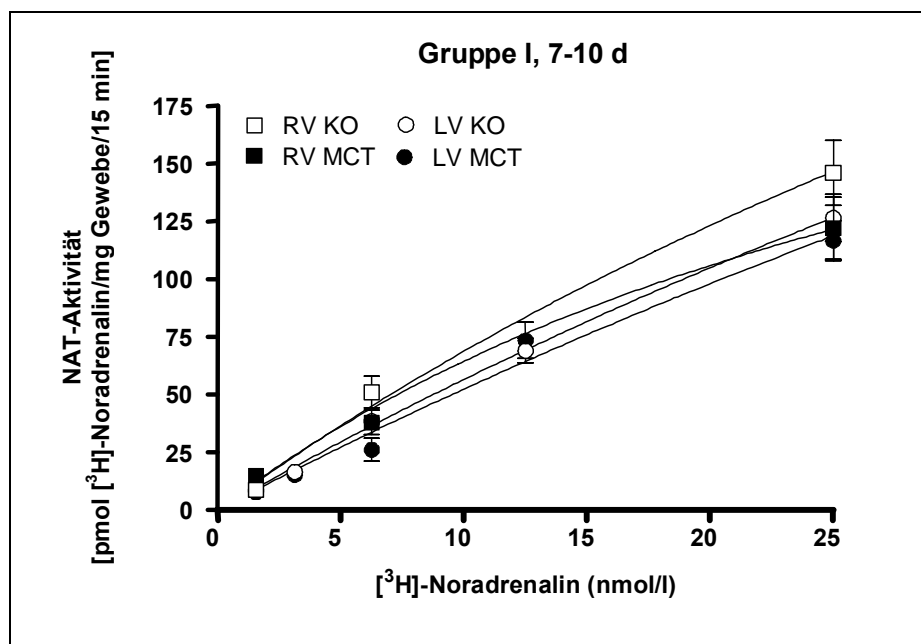


Abbildung 14a: NAT-Aktivität in rechten (RV) und linken Ventrikeln (LV), 7-10 d nach MCT-Applikation. Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von [n=6/6] Experimenten mit \*)  $p < 0,05$  vs. gleichaltrigen Kontrollen (KO).

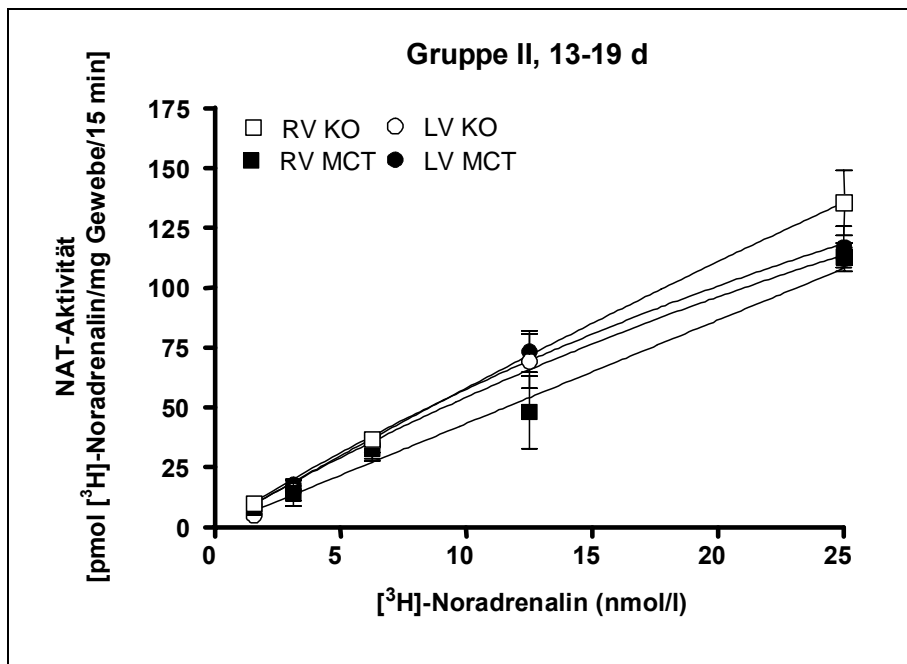


Abbildung 14b: NAT-Aktivität in rechten (RV) und linken Ventrikeln (LV), 13-19 d nach MCT-Gabe. Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von [n=7/7] Experimenten mit \*)  $p < 0,05$  vs. gleichaltrigen Kontrollen (KO).

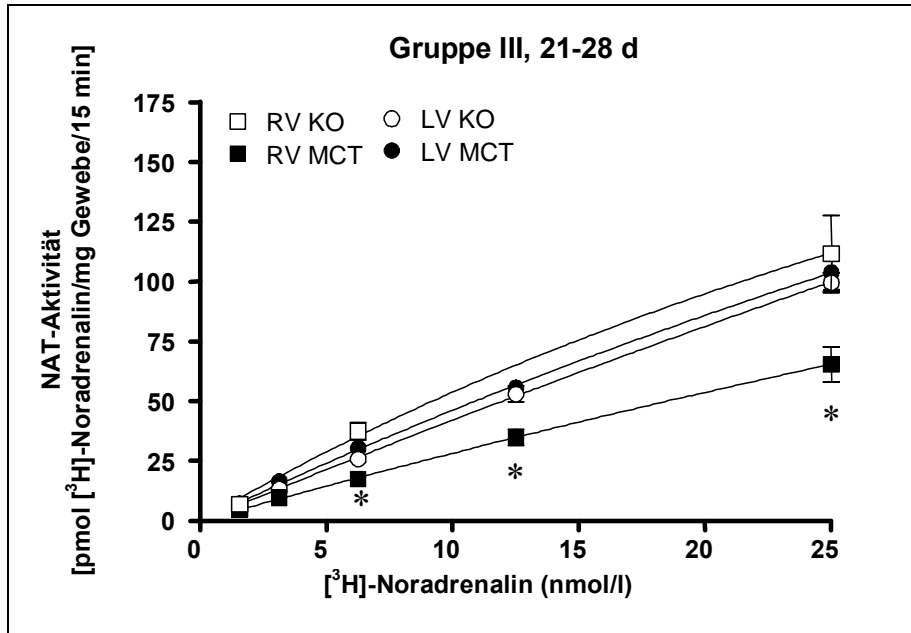


Abbildung 14c: NAT-Aktivität in rechten (RV) und linken Ventrikeln (LV), 21-28 d nach MCT-Applikation. Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von [n=7/7] Experimenten mit \*)  $p < 0,05$  vs. gleichaltrigen Kontrollen (KO).

### 3.5. Noradrenalin-induzierte Kontraktion der Arteria pulmonalis und Aorta thoracica

Das Kontraktionsverhalten der Arteria pulmonalis und der Aorta thoracica in Abhängigkeit von der NA-Konzentration für alle drei Zeitintervalle ist in den Abbildungen 15a und 15b dargestellt. Im Zeitraum I (7-10 Tage nach MCT-Applikation) zeigten die MCT-behandelten Tiere im Vergleich zu ihren Kontrollen keine Veränderungen in der Kontraktion der Aorta thoracica und der Arteria pulmonalis. Die MCT-Ratten der Gruppe II (13-19 Tage nach MCT-Gabe) zeigten, analog den Tieren der Gruppe I, keine Veränderung im Kontraktionsverhalten der Aorta thoracica, jedoch war verglichen mit den Kontrolltieren eine signifikante Abnahme um 63,5% der Kontraktion bei der Arteria pulmonalis zu erkennen.

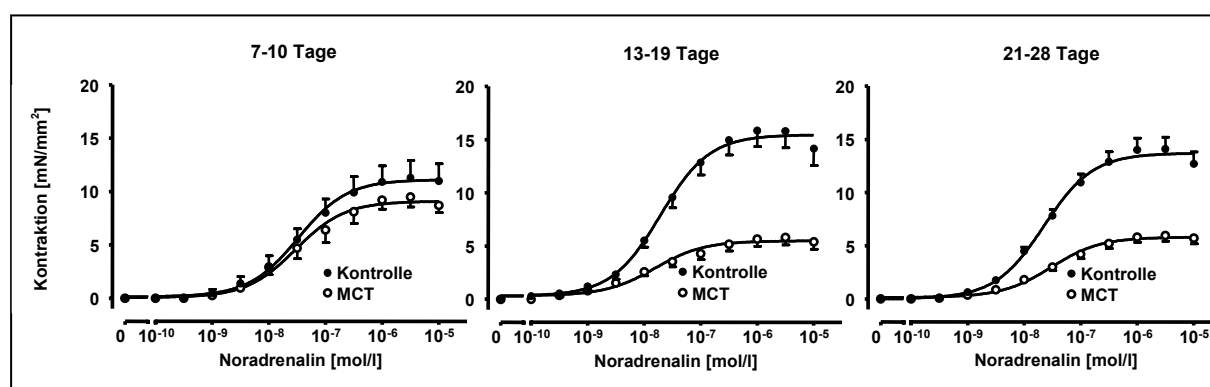


Abbildung 15a: Noradrenalin-induzierte Kontraktion der Arteria pulmonalis 7-10 [4/4], 13-19 [11/16] und 21-28 [24/19] Tage nach MCT-Applikation. Ordinate: Kontraktionskraft in  $\text{mN}/\text{mm}^2$ . Abszisse: Molare Konzentration von Noradrenalin. Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von [n/n] Experimenten mit \*)  $p < 0.001$  vs. gleichaltrigen Kontrollen.

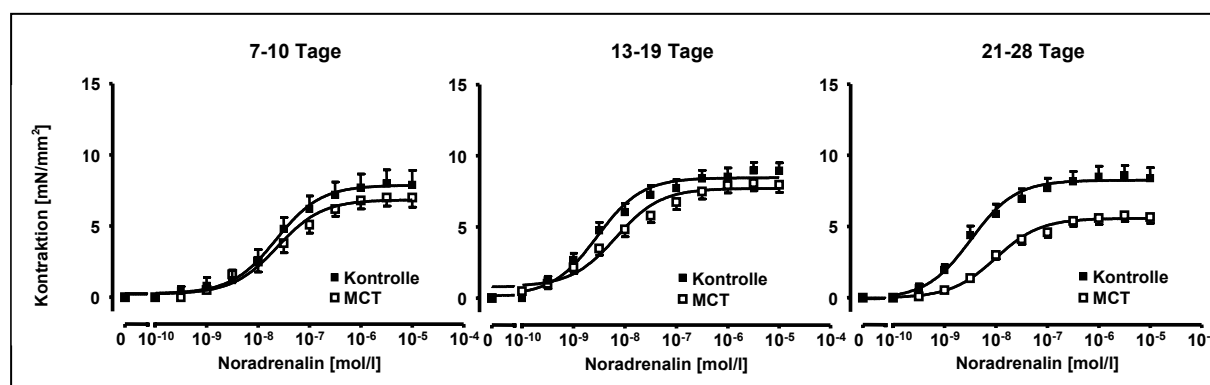


Abbildung 15b: Noradrenalin-induzierte Kontraktion der Aorta thoracica 7-10 [4/4], 13-19 [10/18] und 21-28 [19/14] Tage nach MCT-Applikation. Ordinate: Kontraktionskraft in  $\text{mN}/\text{mm}^2$ . Abszisse: Molare Konzentration von Noradrenalin. Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von [n/n] Experimenten mit \*)  $p < 0.01$  vs. gleichaltrigen Kontrollen.

Im Stadium der schwerwiegenden RHH (21 bis 28 Tage nach MCT-Applikation; Zeitintervall III) wiesen die MCT-Tiere im Vergleich zu den Kontrollen sowohl in der Arteria pulmonalis



(Abnahme um 58,2%) als auch in der Aorta thoracica (um 32,6%) eine deutliche Reduktion der NA-induzierten Maximalkontraktion auf.

Die  $pD_2$ -Werte (NA-Konzentration, welche eine halbmaximale Kontraktion auslöst in  $-\log$  mol/l) und die NA-induzierte maximale Kontraktion ( $E_{max}$  in  $mN/mm^2$ ) sind für alle drei Zeitintervalle in Tabelle 5 zusammengefaßt dargestellt. Im Gegensatz zu einer signifikanten Abnahme der  $E_{max}$ -Werte 13-19 Tage bei der Arteria pulmonalis sowie bei beiden untersuchten Gefäßtypen 21-28 Tage nach MCT-Gabe, waren die  $pD_2$ -Werte der MCT-Tiere verglichen mit den Kontrolltieren unverändert.

Gefäße		Kontrollen		MCT	
		$pD_2$	$E_{max}$	$pD_2$	$E_{max}$
Arteria pulmonalis	7-10 Tage [4/4]	7,49±0,03	11,3±1,6	7,53±0,06	9,5±1,0
	13-19 Tage [11/16]	7,73±0,05	15,9±1,5	7,90±0,09	5,8±0,7 <sup>***</sup>
	21-28 Tage [24/19]	7,65±0,04	14,1±1,1	7,55±0,05	5,9±0,5 <sup>***</sup>
Aorta thoracica	7-10 Tage [4/4]	7,67±0,04	8,0±0,9	7,65±0,07	7,0±0,7
	13-19 Tage [10/18]	8,57±0,07	9,0±0,6	8,36±0,10	8,1±0,7
	21-28 Tage [19/14]	8,47±0,05	8,6±8,6	7,99±0,05	5,8±0,5 <sup>**</sup>

**Tabelle 5:**  $pD_2$ -Wert = NA-Konzentration [ $-\log$  mol/l] mit halb-maximalem Effekt,  $E_{max}$  = NA-induzierte maximale Kontraktion in  $mN/mm^2$ . Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von [n/n] Experimenten mit \*\*)  $p < 0.01$ , \*\*\*)  $p < 0.001$  vs. Kontrollen.

Zusammenfassend demonstrierten diese Experimente zur Darstellung vaskulärer Veränderungen eine signifikante Abnahme der NA-induzierten Kontraktion in den Pulmonalarterien bereits im Stadium 13-19 Tage nach MCT-Gabe. Eine Reduktion der Kontraktion in Aorta thoracica, wenn auch bedeutend geringer als in Pulmonalgefäßen, konnte erst 21-28 Tage nach MCT-Gabe festgestellt werden, möglicherweise als Zeichen einer schwerwiegenden Hypertrophie/RHI mit globalen/systemischen Effekten.

## 4. Diskussion

### 4.1 Monocrotalin-Tiermodell

Das MCT-Modell ist ein etabliertes Tiermodell zum Studium der kardialen Effekte einer pulmonalen Hypertonie. In Experimenten, bei denen dieses Tiermodell zur Anwendung kam, zeigte sich, dass eine einmalige Injektion des Pyrrolizidin-Alkaloides Monocrotalin bei Ratten, innerhalb kürzester Zeit, eine schwerwiegende pulmonale Hypertonie hervorruft (KAY et al., 1967; GHODSI & WILL, 1981; CECONI et al., 1989; WERCHAN et al., 1989; BROWN et al., 1998). Aufgrund der daraus resultierenden Druckbelastung des rechten Ventrikels kommt es kompensatorisch zur Entwicklung einer Rechtsherzhypertrophie, die terminal in einem Pumpversagen des Herzens (dekompensierte Rechtsherzinsuffizienz) gipfelt. Da der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Progression der Rechtsherzhypertrophie bzw. -insuffizienz lag, erfolgte die Einteilung der Ratten basierend auf den Ergebnissen anderer Studien (GHODSI & WILL, 1981; CECONI et al., 1989; WERCHAN et al., 1989; SEYFAHRT et al., 2000) in drei Zeitintervalle; einem Vorstadium 7-10 Tage nach MCT-Gabe, einem Stadium der rechtsventrikulären Hypertrophie (RHH) 13-19 Tage und einem Stadium der schwerwiegenden RHH mit Rechtsherzinsuffizienz (RHI) 21-28 Tage nach MCT-Gabe.

Es zeigte sich analog den genannten Publikationen eine signifikante Zunahme der rechtsventrikulären Gewichte 13-19 Tage nach MCT-Gabe, welche innerhalb des dritten Zeitintervalls weiterhin anstieg und so zu einer signifikanten Zunahme der Herzgesamtgewichte führte. Die linksventrikulären Gewichte waren in allen drei Zeitintervallen nahezu gleichbleibend. Dies steht im Einklang mit nahezu allen veröffentlichten Studien zum MCT-Modell. Darüber hinaus nahm nicht nur der vom Körpergewicht der Tiere abhängige Hypertrophie-Marker RVG/KG im zeitlichen Verlauf signifikant zu, sondern auch der vom Körpergewicht unabhängige Hypertrophie-Marker RVG/LVSG wies eine signifikante Zunahme bereits im Stadium II und noch bedeutender im Stadium III auf, analog den Ergebnissen von VESCOVO et al. (1989) und UZZAMANN et al. (2000). Darüber hinaus zeigte der überwiegende Teil der Tiere aus dem zweiten Zeitintervall und fast alle Tiere im dritten Zeitintervall Symptome eines pulmonalen Hochdrucks wie Dys- und Tachypnoe verbunden mit ausgeprägten Veränderungen an den inneren Organen wie beispielsweise einer deutlichen Hepatomegalie und einer signifikanten Zunahme der Lungengewichte sowie weiteren typischen Stauungszeichen wie Aszitis, Pleura- und Perikardergüsse (BROWN et al., 1998; COMINI et al., 1996; SEYFARTH et al., 2000). Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den oben genannten Publikationen. Die Verwendung dieses Tiermodells und die vorgenommene Einteilung in die drei Zeitintervalle spiegelt somit die Progression einer rechtsventrikulären Hypertrophie mit der Entwicklung einer RHI wider und ist daher gut geeignet, um verschiedene Effekte im sympathoadrenergen System näher zu untersuchen.

Die bei den bisher veröffentlichten Studien applizierte Dosis von MCT zeigt Rattenstamm-spezifische Unterschiede. Sie variierte von 30 mg/kg KG bei VESCOVO et al. (1989) über 60 mg/kg KG bei GHODSI & WILL (1981), MORIOKA et al. (1992), WERCHAN et al. (1989), LEINWEBER et al. (2000), SEYFARTH et al. (2000), UZZAMANN et al. (2000) und DHEIN et al. (2002) bis 105 mg/kg KG bei WANSTALL & O'DONNELL (1990) und BROWN et al. (1998). Vorangegangene Experimente zeigten, dass bei dem von uns verwendetem Wistar-Rattenstamm 50 mg MCT/kg KG eine geeignete Dosis darstellte, um ein Überleben der Tiere zu gewährleisten (minimale Verluste durch Tod aufgrund der akut toxischen Effekte des MCT) bei gleichzeitiger Manifestation einer pulmonalen Hypertonie mit einer sich im weiteren Verlauf entwickelnden kompensatorischen rechtsventrikulären Hypertrophie. Die gleiche Dosis wurde ebenfalls bei den Arbeiten von COMINI et al. (1996) und CECONI et al. (1989) verwendet.

Vor der Bestimmung der ventrikelspezifischen NAT-Dichte und -Aktivität, der  $\beta$ -AR-Dichte und -Subtypverteilung sowie der GRK-Aktivität erfolgte die Messung der NA-Konzentration im Blutplasma, als indirekter Index der neurohumeralen Aktivierung für das jeweilige Zeitintervall. Im Vorstadium der rechtsventrikulären Hypertrophie und im Stadium der RHH veränderten sich die pNA-Spiegel nicht, wohingegen im Stadium der schwerwiegenden RHH/RHI eine signifikante Erhöhung zu verzeichnen war (3.1.2.). Dies steht im Konsens mit den Ergebnissen von MORIOKA et al. (1992).

Für das wesentlich häufigere Krankheitsbild der Linksherzinsuffizienz konnte an Patienten ein signifikanter Anstieg der pNA-Konzentration gezeigt werden (CHIDSEY et al., 1962; THOMAS & MARKS 1978; LEVINE et al., 1982; HASKING et al., 1986), der im direkten Zusammenhang mit einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität bei Patienten mit Herzinsuffizienz steht. Somit stellt die Bestimmung der pNA-Konzentration einen wichtigen prognostischen Marker bei diesen Patienten dar (COHN et al., 1984, 1989; RECTOR et al., 1987) und auch in dieser Studie korrelierte die Höhe des pNA-Spiegel mit dem Schweregrad der RHI.

Da die systemisch vorliegenden pNA-Konzentrationen wie unter 1.1. beschrieben einerseits vom Umfang des freigesetzten NA und andererseits von der neuronalen Wiederaufnahme (Uptake<sub>1</sub>), sowie am insuffizienten Herzen untergeordnet von der extraneuronalen Inaktivierung (Uptake<sub>2</sub>) abhängen, ist sie als alleiniger Parameter der neurohumeralen Aktivierung bei RHH/RHI eher kritisch zu werten. Der aufgezeigte signifikante Anstieg der pNA-Konzentration im Stadium der schwerwiegenden RHH/RHI ist nicht nur auf die vermehrte Freisetzung des Transmitters aus den sympathischen Nervenendigungen zurückzuführen, sondern resultiert auch aus einer Abnahme der neuronalen NA-Clearance, als Folge einer Reduktion der neuronalen NAT-Dichte und -Aktivität (3.4.1. und 3.4.2.). Diese enge Verknüpfung zwischen gesteigerter NA-Freisetzung und verminderter NA-

Wiederaufnahme spiegelt sich ebenfalls in den Ergebnissen von LIANG et al. (1989), UNGERER et al. (1996a) und BÖHM et al. (1995, 1998) wider.

In Gruppe III, 21-28 Tage nach MCT-Applikation, konnte eine weitere Zunahme der rechtsventrikulären Hypertrophie beobachtet werden, die nun verbunden war mit deutlich erhöhten pNA-Spiegeln. Darüber hinaus demonstrierten bereits CECONI et al. (1989), dass eine bei Ratten vier Wochen nach MCT-Applikation entstandene schwerwiegende RHH mit einer markanten Abnahme des rechtsventrikulären NA-Gehaltes verbunden ist. In einer früher durchgeführten Studie unserer Arbeitsgruppe konnte ebenfalls die ventrikelspezifische Abnahme des rechtsventrikulären NA-Gehaltes bei nahezu unveränderten linksventrikulären NA-Gehalt bei Ratten vier bis sechs Wochen nach MCT-Applikation aufgezeigt werden (LEINWEBER et al., 2003). Die aufgezeigte Zunahme der pNA-Spiegel einerseits, welche die vermehrte NA-Freisetzung über die synaptischen Nervenendigungen reflektiert und die Verarmung der NA-Speicher im myokardialen Gewebe (CHIDSEY et al., 1965; PORT et al., 1990; BRISTOW et al., 1992c; BÖHM, 2000) auf der anderen Seite spiegeln ein klassisches Muster bei chronischer Herzinsuffizienz wider und kennzeichnen die erhöhte sympathische Aktivität (FRANCIS & COHN, 1986).

#### **4.2. Kardiale $\beta$ -Adrenozeptoren**

Die signifikante Abnahme der rechtsventrikulären  $\beta$ -AR-Dichte bereits 7-10 Tage nach MCT-Gabe (Gruppe I) ist höchstwahrscheinlich auf die akut toxischen Effekte des Dehydromonocrotalin auf die Endothelzellen der Pulmonalarterien zurückzuführen (1.3.). Fast alle Studien zum MCT-Modell zeigen innerhalb der ersten 1-2 Wochen nach MCT-Gabe eine generalisierte Abnahme des Allgemeinzustandes und einen deutlichen Appetitverlust der Tiere (CHODSI & WILL, 1981; VESCOVO et al., 1989). Diese Beobachtung untermauern die Ergebnisse von CECONI et al. (1989), die in diesem frühen Zeitraum fast 20% ihrer Tiere aufgrund der akut toxischen Wirkung des MCT verloren. Dieser Zustand stabilisierte sich jedoch innerhalb der dritten Woche nach MCT-Gabe wieder. Dies demonstrierten auch die Ergebnisse aus dem zweiten Zeitintervall (13-19 Tage nach MCT-Gabe). Die totale  $\beta$ -AR-Dichte des rechten Ventrikel lag nun wieder deutlich über der im Zeitintervall I und zeigte keinen Unterschied mehr gegenüber den Kontrollen (siehe 3.2, Abbildung 11). Diese Beobachtung kann, aufgrund der Neubildung von Endothelzellen, als ein Erholungseffekt von der akuten systemischen Wirkung des MCT gewertet werden (CECONI et al., 1989). Ein direkter Vergleich der  $\beta$ -AR-Dichte mit anderen Publikationen ist leider nicht möglich, da keine weitere Arbeitsgruppe in diesem frühen Zeitraum nach MCT-Gabe die  $\beta$ -AR-Dichte untersucht hat. Dies geschah frühestens zwei Wochen nach MCT-Injektion.

Die  $\beta$ -AR-Dichte der MCT-Ratten der Gruppe II blieb bei den durchgeführten Versuchen weitgehend unverändert gegenüber den Kontrolltieren. Jedoch ließ sich eine signifikante Verschiebung des rechtsventrikulären  $\beta_1:\beta_2$  AR-Verhältnis zugunsten der  $\beta_2$ -AR bei den MCT-behandelten Tieren feststellen. Das linksventrikuläre  $\beta_1:\beta_2$  AR-Verhältnis blieb indes unverändert (siehe 3.2., Tabelle 3b). Die Ursachen für diese Veränderungen, bei nahezu unveränderter  $\beta$ -AR-Dichte, können nur vermutet werden. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass für die Bestimmung der  $\beta$ -AR-Dichte und -Subtypenverteilung ausschließlich ventrikuläre Rohmembranauspensionen verwendet wurden (2.3.2.). Diese setzen sich nicht nur aus kontraktiven Kardiomyozyten zusammen, die ein  $\beta_1:\beta_2$  AR-Verhältnis von ca. 75-80:20-25% zeigen (CERBAI et al., 1995; KUZNETZOV et al., 1995; XIAO et al. 1998; STEINBERG et al., 1999; LEINWEBER et al., 2003), sondern auch aus anderen Zelltypen, die einen bedeutend höheren prozentualen  $\beta_2$ -AR-Anteil vorweisen. So demonstrierten LAU et al. (1980) einen hohen  $\beta_2$ -AR-Anteil in myokardialen Fibroblasten von Ratten, FREISSMUTH et al. (1986) einen bedeutenden Anteil von  $\beta_2$ -AR in koronaren Endothelzellen von Ratten und MOLENAAR et al. (1987, 1988) an kardialen Zellen des Reizleitungssystems, an Koronarien und großen mit dem Herzen verbundenen Blutgefäßen (Pulmonalarterien, Aorta, Vena cava sup. und inf.) sowie epikardialen Gewebe von Kaninchen und Schweinen (Guinea pigs).

Bei der Entwicklung einer rechtsventrikulären Hypertrophie kommt es vor allem auch zum Zuwachs dieser Zelltypen, insbesondere der Fibroblasten im ventrikulären Gewebe, mit der Konsequenz eines erhöhten  $\beta_2$ -AR-Anteils (3.2., Tabelle 3b). Durch die somit entstandene relative Abnahme des  $\beta_1$ -AR-reichen Kardiomyozytenanteils im hypertrophierten rechten Ventrikel könnte die beobachtete Verschiebung des  $\beta_1:\beta_2$  AR-Verhältnis zugunsten der  $\beta_2$ -AR erklärt werden.

Die beobachtete signifikante Abnahme der rechtsventrikuläre  $\beta$ -AR-Dichte 21-28 Tage (Stadium der schwerwiegenden RHH/RHI = Hypertrophie des rechten Ventrikel + starke kompensatorische neurohumorale Aktivierung) nach Injektion des Pyrrolizidin-Alkaloides steht im Einklang mit sämtlichen Veröffentlichungen zum MCT-Modell (VESCOVO et al., 1989; PELA et al., 1990; ISHIKAWA et al., 1991; YOSHI et al., 1994; BROWN et al., 1998; SEYFARTH et al., 2000). Die fortgeschrittene Downregulation der rechtsventrikulären  $\beta$ -AR MCT-behandelter Ratten in diesem Zeitintervall ist hauptsächlich auf die signifikante Reduktion der  $\beta_1$ -AR zurückzuführen. Dies steht im Einklang mit der beobachteten signifikanten Abnahme der NAT-Dichte (3.4.1.) bzw. -Aktivität (3.4.2.) der MCT-behandelten Tiere dieses Zeitintervalls. LIANG et al. (1989) und DONG et al. (1999) bekräftigen mit ihren Veröffentlichungen diesen Zusammenhang, indem sie eine signifikante Korrelation zwischen der Abnahme der NAT-Dichte bzw. -Aktivität und einer  $\beta$ -AR Downregulation aufzeigen.

Darüber hinaus wurde eine, wenn auch deutlich geringere und nicht signifikante Abnahme der linksventrikulären totalen  $\beta$ -AR-Dichte verzeichnet, welche entsprechend zum rechten Ventrikel auf eine Verringerung der  $\beta_1$ -AR zurückzuführen ist (3.2.). Jedoch stellte sich nur rechtsventrikulär ein signifikanter Shift im  $\beta_1:\beta_2$  AR-Verhältnis in Richtung  $\beta_2$ -AR dar.

Bei der Beurteilung der totalen  $\beta$ -AR-Dichte und -Subtypisierung in linken Ventrikeln existieren abweichende Ergebnisse innerhalb der Publikationen zum MCT-Modell. Einige Arbeitsgruppen zeigten eine signifikante Abnahme der  $\beta$ -AR-Dichte im linken Ventrikel im Stadium der schwerwiegenden RHH/RHI (ISHIKAWA et al., 1991; BROWN et al., 1998; SEYFARTH et al., 2000) und andere wiederum keine bzw. wie in der vorliegenden Arbeit, eine nur geringe linksventrikuläre Abnahme der  $\beta$ -AR-Dichte im Vergleich mit dem hypertrophierten rechten Ventrikel (PELA et al., 1990). BRISTOW et al. (1992) zeigten darüber hinaus an Patienten mit primärer pulmonaler Hypertonie ebenfalls ausschließlich kammer-spezifische Veränderungen der  $\beta$ -AR in rechten Ventrikeln.

YOSHI et al. (1994) stellten bei MCT-behandelten Ratten mit ausgeprägter RHH nicht nur eine Abnahme der  $\beta$ -AR-Dichte im rechten Ventrikel (ohne Abnahme im linken Ventrikel), sondern auch im interventrikulären Septum fest. Dies könnte teilweise auch die aufgezeigte Diskrepanz mit den Ergebnissen von SEYFARTH et al. (2000) erklären, die im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit linke Ventrikel, einschließlich Septum, für ihre Versuche verwendeten. Ähnliche Abweichungen wurden ebenfalls bei Untersuchungen zu Veränderungen im kardialen  $\beta$ -AR-System chronisch urämischer Ratten vorgefunden bei denen linke Ventrikel mit bzw. ohne interventrikulärem Septum verwendet wurden (LEINEWEBER et al., 2002b).

Die selektive, jedoch nicht ventrikelspezifische, Abnahme von  $\beta_1$ -AR in beiden Ventrikeln, mit nur marginalen Veränderungen bei den  $\beta_2$ -AR (tendenziell geringe Abnahme) steht im Einklang mit den Resultaten von PELA et al. (1990) und BROWN et al. (1998). FAN et al. (1987) demonstrierten darüber hinaus am Modell rechtsherzinsuffizienter Hunde nach Pulmonalarterienstenose eine ventrikelspezifische und selektive Abnahme von  $\beta_1$ -AR.

Die Effekte auf die GRK-Aktivität stehen im Einklang mit den Ergebnissen zur  $\beta$ -AR-Dichte. Es zeigte sich ausschließlich im dritten Zeitintervall (21-28 Tage nach MCT-Gabe) eine ventrikelspezifische signifikante Erhöhung sowohl der zytosolischen als auch der Membran-assoziierten GRK-Aktivität (3.3., Abbildung 12). GRK's interagieren spezifisch mit Agonist-aktivierten Formen von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (INGLESE et al., 1993; LEFKOWITZ, 1993; PENN et al., 2000). Bis heute wurden sieben Subtypen identifiziert, wobei am Herzen ausschließlich eine Expression von GRK2, GRK3 und GRK5 mit einer ausgeprägten Dominanz der GRK2 nachgewiesen werden konnte (IACCARINO & KOCH 1999; BRODDE & MICHEL, 1999; PENN et al., 2000). Die dominante GRK2, welche auch  $\beta$ -Adrenorezeptor-Kinase 1 ( $\beta$ ARK 1; AKTHER et al., 1997a) genannt wird, ist hauptsächlich für die Phosphorylierung von  $\beta$ -AR bei übermäßiger Agonisten-Stimulation verantwortlich und vermag auf diese Weise die Rezeptoren vom  $G_s$ -Protein-Adenylyl-Cylase-System zu

entkoppeln (INGLESE et al., 1993; LEFKOWITZ, 1993; FREEDMAN et al., 1995; KRUPNICK & BENOVIC, 1998; IACCARINO et al., 1999). Eine Aktivitätserhöhung dieses Enzyms spielt somit eine Schlüsselrolle bei den Veränderungen innerhalb der  $\beta$ -adrenergen Signaltransduktion bei der Entwicklung einer rechtsventrikulären Hypertrophie bzw. Insuffizienz. DE BLASI et al. (1995) demonstrierten darüber hinaus, dass die im kardialen Gewebe vorkommenden GRK's das als Substrat verwendete Rhodopsin mit unterschiedlicher Spezifität phosphorylieren: GRK2 >> GRK3 = GRK 5. Dies unterstreicht ebenfalls die These, dass bei der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methode zur Bestimmung der GRK-Aktivität vornehmlich die Aktivität der GRK2 untersucht wurde. Die Aktivierung der im Zytosol gelösten inaktiven Zustandsformen von GRK2 und GRK3 erfolgt über ihre Translokation an die Zellmembran mit Hilfe der  $\beta\gamma$ -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine (PITCHER et al., 1998; KOCH et al., 1993). Die GRK5 liegt bereits Membran-assoziiert vor (PREMONT et al., 1994; KRUPNICK & BENOVIC, 1998).

Die ermittelte ventrikelspezifische Aktivitätszunahme der GRK für beide Fraktionen ist nur unter Vorbehalt mit den bisher vorliegenden Veröffentlichungen zu GRK-Aktivität in der Herzinsuffizienz zu vergleichen. Fast ausschließlich alle Arbeiten, sowohl am Menschen (UNGERER et al., 1993, 1994; GROS et al., 1997) als auch in tierexperimentellen Studien (UNGERER et al. 1996b; AHKTER et al. 1997b; CHOI et al., 1997; ROCKMAN et al., 1998, URASAWA et al. 1996; IACCARINO et al., 1998, 1999; VINGE et al., 2001) charakterisierten die GRK an linksventrikulärem Gewebe bei Linksherzhypertrophie bzw. -insuffizienz. Die dort ermittelten Aktivitätszunahmen der GRK stehen, auch wenn sie nicht ventrikelspezifisch für den rechten Ventrikel beurteilt werden können, jedoch in gutem Einklang mit den ermittelten Ergebnissen.

Einzig LEINEWEBER et al. (2003) bestimmten getrennt für beide Ventrikel, am Modell der MCT-induzierten pulmonalen Hypertonie, die GRK-Aktivität an isolierten Kardiomyozyten. Es zeigte sich in weitgehender Übereinstimmung mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit eine ausschließlich rechtsventrikuläre signifikante Steigerung der GRK-Aktivität in zytosolischen Fraktionen und eine, jedoch nicht signifikante, Zunahme in den Membran-assoziierten Präparationen in Vergleich mit den Kontrollen vier bis sechs Wochen nach MCT-Applikation.

Die Mechanismen die zu einer erhöhten GRK-Aktivität führen sind noch nicht vollständig aufgeklärt. In der Herzinsuffizienz spielt die kompensatorische Zunahme der sympathischen Aktivität (erhöhte systemische und lokale NA-Spiegel) verbundenen mit der chronischen Stimulation der  $\beta$ -AR eine Schlüsselrolle (IACCARINO & KOCH, 1999; PENN et al., 2000). Dies bewirkt über eine gesteigerte Translation der GRK-mRNA, deren erhöhte Expression, welches in erhöhten GRK-Protein-Spiegeln aber auch in einer Zunahme der zytosolischen GRK-Aktivität zum Ausdruck kommt, wie IACCARINO et al. (1998, 1999) nach Stimulation mit Isoprenalin an Mäusen demonstrierten.

Ein weiterer ursächlicher Mechanismus, der zu einer Steigerung der GRK-Aktivität führen soll, wurde in der alleinigen Entwicklung der ventrikulären Hypertrophie gesehen, wie die Ergebnisse von CHOI et al. (1997) an Mäusen demonstrieren. Die in dieser Arbeit durch Aortenkonstriktion induzierte ventrikuläre Hypertrophie war verbunden mit einer signifikanten Zunahme der GRK-Aktivität, welche wiederum zu einem reduzierten Ansprechen der  $\beta$ -AR führte. In weiterführenden Experimenten an transgenen Mäusen (homozygot für eine Überexpression des kardialen Ziel-Onkogens *ras*, welches zur Entwicklung einer schwerwiegenden kardialen Hypertrophie ohne das Vorhandensein einer hämodynamischen Überlastung mit neurohumeraler Aktivierung führt, HUNTER et al., 1995), zeigten CHOI et al. (1997) jedoch, dass die alleinige Entwicklung einer signifikanten Hypertrophie (LVG/KG 62% erhöht) nicht zu Veränderungen bei der  $\beta$ -AR-Dichte und der GRK-Aktivität führt. Dementsprechend demonstrieren IACCARINO et al. 1999, dass eine ventrikuläre Hypertrophie nur in Verbindung mit einer chronischen kardialen  $\beta_1$ -adrenergen Stimulation zu einer signifikanten Erhöhung der GRK-Aktivität führt. Dies steht im Einklang mit den vorliegenden Ergebnissen, da 13-19 Tage nach MCT-Gabe zwar schon eine signifikante rechtsventrikuläre Hypertrophie nachzuweisen war (RVG/KG mehr als 52% erhöht), jedoch ohne signifikante Veränderungen der  $\beta$ -AR-Dichte und der GRK-Aktivität. Erst im Stadium der schwerwiegenden RHH/RHI, indem sich zu der Hypertrophie auch noch eine signifikante neurohumorale Aktivierung (erhöhte pNA-Spiegel, Abnahme der NAT-Dichte und -Aktivität) zeigte, stieg die GRK-Aktivität signifikant an und es kam zu einer nachweisbaren Downregulation der  $\beta$ -AR. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die signifikante Erhöhung der GRK-Aktivität nicht auf die Progression der rechtsventrikulären Hypertrophie 21-28 Tage nach MCT-Gabe zurückzuführen ist (3.1.1., Tabelle 2; 13-19 Tage um 52% erhöht vs. 21-28 Tage um 133% erhöht) sondern auf die Aktivierung des sympathoadrenergen Systems.

### **4.3. Noradrenalin-Transporter**

Bisherige Studien zur chronischen Herzinsuffizienz demonstrieren, sowohl an Patienten als auch in tierexperimentellen Modellen, einen Zusammenhang zwischen dem Funktionsverlust der kardialen  $\beta$ -AR und den erhöhten NA-Spiegeln (1.1.). Wie bereits beschrieben werden diese auf die kompensatorisch gesteigerte sympathischen Aktivität mit Erhöhung des zirkulierenden Noradrenalins (THOMAS & MARKS 1978; COHN et al., 1984) und einer vermehrten lokalen kardialen/neuronalen NA-Freisetzung zurückgeführt (BRISTOW et al., 1984). Im Verlauf der Erkrankung wird jedoch nicht nur eine Erhöhung der interstitiellen NA-Konzentration (SWEDBERG et al., 1984; ROSE et al., 1993) sondern auch eine signifikante Entleerung der kardialen NA-Speicher (CHIDSEY et al., 1965; CHIDSEY & BRAUNWALD, 1966; PIERPONT et al., 1987; PORT et al., 1990; ANDERSON et al., 1992) beobachtet. Diese



Veränderungen könnten beide, zumindest teilweise, mit einem Funktionsverlust des NAT erklärt werden. Die Abnahme des neuronalen Uptake<sub>1</sub> verhindert die Wiederaufnahme des Transmitters in die sympathischen Nervenendigungen mit dem Resultat einer Konzentrationserhöhung des NA im synaptischen Spalt und einer Entleerung der kardialen NA-Speicher. Die bei Herzinsuffizienz beobachtete Abnahme der NAT-Dichte und -Aktivität (PETCH & NEYLER, 1979; SANDOVAL et al., 1989; BÖHM et al., 1995) forciert somit die Desensibilisierung und letztendlich die Downregulation der kardialen  $\beta$ -AR, aufgrund deren übermäßiger Stimulation. Das Aufzeigen von zeitlichen und ventrikelspezifischen Veränderungen innerhalb des NAT-Systems diene deshalb zur Charakterisierung eines weiteren bedeutenden Faktors bei der Entwicklung einer chronischen RHI und sollte darüber hinaus die Hypothese bestätigen, dass vorrangig lokale Mechanismen die neuronale NA-Aufnahme bei Herzinsuffizienz beeinflussen.

Im Einklang mit den bereits diskutierten Ergebnissen zur pNA-Konzentration und  $\beta$ -AR-Dichte zeigte sich im Stadium der schwerwiegenden Hypertrophie/RHI, drei bis vier Wochen nach MCT-Gabe, eine ausschließlich rechtsventrikuläre Abnahme der NAT-Dichte (3.4.1.) verbunden mit einer signifikanten Reduktion der Aktivität des Transporters (3.4.2.), ohne Veränderungen in den linken Ventrikeln. Diese ventrikelspezifische Abnahme wurde sowohl an tierexperimentellen Studien zur Rechts- als auch zur Linksherzinsuffizienz festgestellt (LIANG et al., 1989; HIMURA et al., 1993; YOSHIKAWA et al., 1994; BÖHM et al., 1998; LEINEWEBER et al., 2000) und bestätigt die Annahme, dass eher lokale Ursachen, mit vorrangiger Wirkung im insuffizienten Ventrikel, als systemische Effekte, mit Einfluss auf den gesamten Organismus/das gesamte Herz, für die bereits beschriebenen Effekte auf das  $\beta$ -adrenerge System verantwortlich gemacht werden können.

Welche genauen Mechanismen für die Abnahme der Dichte bzw. Aktivität, der auf den sympathischen Nervenendigungen lokalisierten NAT, verantwortlich sind, konnte bisher noch nicht eindeutig geklärt werden (LIANG et al., 1989). Diskutiert werden zum einen der direkte Verlust von adrenergen Nervenfasern und zum anderen spezifische Mechanismen einer NAT-Downregulation, ähnlich denen der  $\beta$ -AR. Es ist noch nicht hinreichend geklärt, inwieweit die Dichte des NAT durch die NA-Konzentration im synaptischen Spalt oder sogar durch andere Neurotransmitter reguliert wird (LIANG et al., 1989). Wie erwähnt wird als eine Ursache der direkte Verlust (kardialer) noradrenerger Nervenendigungen aufgrund der erhöhten NA-Spiegel bei chronischer Herzinsuffizienz diskutiert. HIMURA et al. (1993) ermittelten bei Hunden mit links- und rechtsventrikulärer Insuffizienz mit Hilfe von Histofluoreszenzuntersuchungen eine ventrikelspezifische Abnahme von noradrenergen Nervenendigungen, die verbunden war mit einer signifikanten Abnahme des NA-Uptake. Um die eindeutige Abhängigkeit der Veränderungen von den erhöhten NA-Konzentrationen zu demonstrieren, wurden ergänzend Untersuchungen an gesunden Hunden mit chronischer NA-Infusion durchgeführt und tatsächlich parallele Veränderungen beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass

vor allem erhöhte NA-Spiegel, wie sie bei Herzinsuffizienz gesehen werden, zu einem Untergang der mit NAT besetzten sympathischen Nervenendigungen führen könnten. Der Verlust der neuronalen NA-Wiederaufnahme führt wie bereits beschrieben zu einer weiteren Erhöhung der Transmitterkonzentration im synaptischen Spalt. Die Veränderungen könnten somit im Sinne eines *circulus vitiosus* in einem weiteren Untergang von sympathischen Nervenendigungen gipfeln.

Die Annahme, dass eine reduzierte Genexpression des NAT als Ursache für seine signifikante Abnahme bei chronischer Herzinsuffizienz verantwortlich sein könnte, widerlegten BÖHM et al. (1998). Sie zeigten keine Veränderungen der NAT-Genexpression mittels RT-PCR am sympathischen zervikalen Ganglion stellatum an transgenen Ratten mit Linksherzinsuffizienz aufgrund Renin-induzierter Drucküberlastung.

Die enge Verknüpfung zwischen den Veränderungen der NAT-Aktivität und einer Abnahme der  $\beta$ -AR-Dichte wurde ebenfalls in weiteren Veröffentlichungen dokumentiert. So zeigten LIANG et al. (1989) und KAWAI et al. (1999) an Hunden mit RHH nach Pulmonalarterienstenose eine eindeutige positive Korrelation zwischen einer Abnahme der  $\beta$ -AR-Dichte und einer Verringerung der NAT-Aktivität. BEAU & SAFFITZ (1994) bestätigten diesen Zusammenhang darüber hinaus an Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz, indem sie ebenfalls eine signifikante positive Korrelation zwischen der  $\beta_1$ -AR-Dichte und der NAT-Aktivität aufzeigten. Diese Ergebnisse stehen ebenfalls in guter Übereinstimmung mit den Untersuchungen von BRISTOW et al. (1992) an Patienten mit primärer pulmonaler Hypertonie. Diese zeigten ausschließlich am insuffizienten rechten Ventrikel eine signifikante Abnahme kardialer NA-Speicher verbunden mit einer signifikanten Abnahme der  $\beta_1$ -AR-Dichte.

Als unmittelbare Folge der Desensibilisierung und nachfolgenden Downregulation vor allem der kardialen  $\beta_1$ -AR kommt es im weiteren Krankheitsverlauf bei chronischer Herzinsuffizienz zu einem massiven Inotropie-Verlust im insuffizienten Herzen. Diese Abnahme der Inotropie wurde nach Stimulation mit Isoprenalin bzw. Noradrenalin bestätigt (BÖHM et al., 1995, 1998). So gipfeln die beschriebenen Vorgänge letztendlich in einen Zusammenbruch der für das insuffiziente Herz überaus bedeutenden Kompensationsmechanismen vermittelt über das  $\beta$ -adrenerge System.

#### **4.4. Kontraktionsmessungen an Arteria pulmonalis und Aorta thoracica**

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Messungen dienten, neben den Untersuchungen zur  $\beta$ -adrenergen Signaltransduktion am Herzen, der ergänzenden Analyse  $\alpha_1$ -adrenerg vermittelter vaskulärer Effekte in Abhängigkeit vom Schweregrad der MCT-induzierten pulmonalen Hypertonie/RHH/RHI.

Dabei zeigte sich bereits 13-19 Tage nach MCT-Applikation (Stadium der leichten rechtsventrikulären Hypertrophie) eine signifikante Abnahme des maximalen

Kontraktionsvermögens der Arteria pulmonalis, das im Stadium der schwerwiegenden Hypertrophie/RHI (21-28 Tage nach MCT-Gabe) jedoch auf dem selben Niveau blieb und keine weitere Verschlechterung zeigte (um 60%; siehe 3.5., Tabelle 5). Eine Abnahme der NA-induzierten Maximalkontraktion in der Aorta thoracica (um 32,6%) konnte erst im Stadium der schwerwiegenden RHH/RHI demonstriert werden. Die  $pD_2$ -Werte (NA-Konzentration, welche eine halbmaximale Kontraktion auslöst in  $-\log$  mol/l) blieben jedoch sowohl in der Arteria pulmonalis als auch in der Aorta thoracica in Übereinstimmung mit DHEIN et al. (2002) ohne wesentliche Veränderung.

Die Gründe für die beobachtete parallele Abnahme der  $E_{max}$ -Werte der zwei untersuchten Gefäßtypen, 21-28 Tage nach MCT-Gabe, auch wenn die Reduktion des maximalen Kontraktionsvermögens der Aorta thoracica verglichen mit der Arteria pulmonalis bedeutend geringerer ausfiel (32,6% vs. 58,2%), können nur vermutet werden. Die Analyse der in zahlreichen Veröffentlichungen diskutierten Ursachen für die Abnahme der maximalen NA-induzierten Gefäßkontraktion in der Arteria pulmonalis am Modell der MCT-induzierten pulmonalen Hypertonie bietet einige Erklärungen an.

Als ein Mechanismus wird eine Downregulation der vaskulären  $\alpha_1$ -AR, analog den  $\beta$ -AR, aufgrund der erhöhten NA-Spiegel bei MCT-induzierter RHH/RHI diskutiert. Durch die Ergebnisse zahlreicher Veröffentlichungen, insbesondere auch durch frühere Arbeiten unserer Arbeitsgruppe herrscht ein weitgehender Konsens darüber, dass der vorrangige  $\alpha_1$ -AR-Subtyp, der die NA-induzierte Kontraktion in der Arteria pulmonalis vermittelt der  $\alpha_{1D}$ -AR ist (HUSSAIN & MARSHALL, 1997; DHEIN et al., 2001 und 2002). Daneben konnten jedoch auch Kontraktionseffekte *via* über  $\alpha_{1B}$ -AR und untergeordnet für  $\alpha_{1A}$ -AR demonstriert werden (DHEIN et al., 2001 und 2002). Die Kontraktion im thorakalen Abschnitt der Aorta wird ebenfalls vorrangig über  $\alpha_{1D}$ -AR, jedoch auch mit einer geringen Beteiligung von  $\alpha_{1B}$ -AR und  $\alpha_{1A}$ -AR vermittelt (TESTA et al., 1995a, b; XU & HAN, 1996; VILLABOLOS-MOLINA & IBARRA, 1996; HUSSAIN & MARSHALL, 1997; FAGURA et al., 1997; DHEIN et al., 2001, 2002). Da YANG et al. (1999) für die  $\alpha_{1B}$ -AR eine größere Anfälligkeit zur Desensibilisierung als für  $\alpha_{1D}$ -AR und  $\alpha_{1A}$ -AR beschreiben, würde dies die Möglichkeit einer Abnahme des Kontraktionsvermögens (über die Downregulation der entsprechenden Subtypen) in Relation zum  $\alpha_{1B}$ -AR-Anteil erklären (Arteria pulmonalis >> Aorta thoracica bei DHEIN et al., 2002). Somit könnte zum einen die bedeutende Abnahme der NA-induzierte Kontraktion in der Arteria pulmonalis, als auch die signifikante, wenn jedoch auch verglichen mit der Arteria pulmonalis, geringe Abnahme der NA-induzierten Maximalkontraktion in der Aorta thoracica erklärt werden.

Man darf jedoch nicht die lokalen Mechanismen vergessen, die ausschließlich eine Abnahme des maximalen Kontraktionsvermögens im pulmonalen Gefäßbett erklären würden. Die direkte MCT-induzierte Erhöhung des intravaskulären Drucks der Pulmonalarterien, mit der Entwicklung einer chronischen pulmonalen Hypertonie, könnte als eine mögliche Ursache in

Betracht gezogen werden. Dies bekräftigen die Ergebnisse von DHEIN et al. (2002), die eine dramatische Erhöhung des rechtsventrikulären Drucks aufzeigten, jedoch ohne signifikante Erhöhung des arteriellen Mitteldrucks. Dies deutet auf einen gesteigerten pulmonalarteriellen Druck, jedoch ohne Erhöhung des intravasalen Drucks im Gefäßbett nicht-pulmonaler Gefäße, wie der Aorta, hin.

LANGLEBEN et al. (1988) diskutierten als weitere, nur lokal im pulmonalen Gefäßbett beobachtete Veränderung, die MCT-induzierte Verdickung der Lamina media mit einer zunehmenden Versteifung der Gefäßwände. Dieser Zustand müßte sich in dem Resultat einer zunehmenden Verschlechterung des allgemeinen vaskulären Kontraktionsvermögens der Arterien widerspiegeln. Ergebnisse anderer Publikationen zum MCT-Modell widersprechen jedoch dieser Hypothese einer allgemeinen Abnahme des Kontraktionsvermögens aufgrund des Nachlassens der Gefäßelastizität. So wiesen beispielsweise WANSTALL & O'DONNELL (1990) zwar eine Abnahme der NA-induzierten Kontraktion nach, jedoch zeigte sich in dieser und anderen Studien nach Gabe des Neurotransmitters Serotonin, der über die Bindung an seinen Rezeptor ( $\text{HT}$ -Rezeptoren) Gefäßkontraktionen auslöst, sogar eine Zunahme der Kontraktion der pulmonalen Gefäße (HILLIKER & ROTH 1985; KANAI et al., 1993; BROWN et al., 1998). Diese Resultate deuten somit ebenfalls darauf hin, dass eher spezifischere Effekte an den vaskulären  $\alpha_1$ -AR eine tragende Rolle spielen könnten, wie die oben beschriebene subtypenspezifische Downregulation aufgrund erhöhter Katecholaminspiegel bei RHH/RHI als die Gefäßanatomie.

Somit könnte die Abnahme der NA-induzierten Kontraktion der Arteria pulmonalis durch die Kombination der lokalen MCT-induzierten Veränderungen (va. pulmonale Hypertonie) verbunden mit der erwähnten Möglichkeit einer Desensibilisierung/Downregulation der  $\alpha_1$ -AR, zurückzuführen sein. Im Gefäßbett der Aorta thoracica kommen zwar die diskutierten MCT-induzierten lokalen Effekte aufgrund ihrer anatomischen Lage kaum zum Tragen, jedoch wäre eine  $\alpha_1$ -adrenerge Downregulation aufgrund der gemessenen erhöhten systemisch wirksamen pNA-Spiegel, analog den Beobachtungen bei den  $\beta$ -AR im Rahmen einer globalen/schweren Herzinsuffizienz, vorstellbar. Diese Überlegungen stehen im Einklang mit den Beobachtungen, dass zwar eine Abnahme in der Aorta thoracica nachgewiesen wurde, diese jedoch bedeutend geringer ausfiel ( $E_{\text{max}}$  32,6% vs. 58,2%). Um genauer zu differenzieren welcher Mechanismus den größten Einfluss auf eine Abnahme des NA-induzierten Kontraktionsvermögens (pulmonale Hypertonie; Media-Hypertrophie/Endothelveränderungen, Höhe des pNA-Spiegels bzw. lokale NA-Spiegel) beim MCT-Modell hat, müssten weiterführende Experimenten zur Bestimmung der Dichte und Aktivität der einzelnen  $\alpha$ -AR Subtypen und Druckmessungen getrennt für Arteria pulmonalis und Aorta thoracica bzw. kleiner Mesenterialgefäße am MCT-Modell in verschiedenen Stadien der Hypertrophie/Insuffizienz durchgeführt werden.

#### 4.5. Weiterführende Gedanken

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnisse am MCT-Modell deuten darauf hin, dass die alleinige Entwicklung einer rechtsventrikulären Hypertrophie (Gruppe II, 13-19 Tage nach MCT-Gabe) noch nicht in der Lage ist, die charakteristischen Veränderungen im myokardialen  $\beta$ -AR-System bei Herzinsuffizienz hervorzurufen. Nur wenn die ventrikuläre Hypertrophie mit einer Steigerung der neurohumoralen Aktivität verbunden ist (Gruppe III, 21-28 Tage nach MCT-Gabe), kann ein Anstieg der GRK-Aktivität bei einer gleichzeitigen Downregulation der  $\beta$ -AR beobachtet werden. Beim verwendeten Modell der MCT-induzierten pulmonalen Hypertonie scheinen dies eher lokale als systemische Effekte zu sein, da ausschließlich für den rechten Ventrikel die NAT-Aktivität signifikant abnahm, eine deutliche Zunahme für die Aktivität der GRK verzeichnet wurde, sowie letztendlich eine Downregulation der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren nachgewiesen werden konnte ( $\beta_1$ -AR-Dichte nahm signifikant ab). Demgegenüber konnten keine oder nur geringfügige Veränderungen dieser Parameter linksventrikulär beobachtet werden. Die vorliegenden Ergebnisse am Tiermodell der MCT-induzierten pulmonalen Hypertonie zeigen eine gute Übereinstimmung mit den beobachteten ventrikelspezifischen Veränderungen innerhalb des myokardialen  $\beta$ -AR-Systems im insuffizienten menschlichen Herzen bei Patienten mit *Cor pulmonale* auf der Basis einer pulmonalen Hypertonie (BRISTOW et al., 1992). Somit eignet sich dieses Modell ausgesprochen gut für weitergehende Untersuchungen zum besseren Verständnis der komplexen Pathomechanismen bei der menschlichen Rechtsherzinsuffizienz und bietet darüber hinaus die Möglichkeit zur Überprüfung neuer Ansätze zur Prophylaxe und Therapie dieses Krankheitsbildes.

Obwohl die beobachteten pathophysiologischen Veränderungen weitgehend denen bei Patienten mit *Cor pulmonale* entsprechen, kann man nicht vollständig ausschließen, dass zumindest teilweise die durch die MCT-Behandlung hervorgerufenen Effekte auf die akut toxischen Wirkungen des Pyrrolizidin-Alkaloides auf die Endothelzellen des pulmonal-arteriellen Gefäßbetts zurückzuführen sind (siehe 4.2., 4.4.). So zeigte sich bei früheren Studien unserer Arbeitsgruppe bei der zeitlichen Entwicklung der rechtsventrikulären Hypertrophie kein Stadium der angepassten/kompensierten Hypertrophie mit normalen Füllungsdrücken, sondern nur eine rechtsventrikuläre Hypertrophie mit akut auftretenden und persistierend hohen rechtsventrikulären systolischen Drücken.

## 5. Zusammenfassung der Ergebnisse

Das Ziel der vorliegenden Arbeit lag in der Charakterisierung zeitlicher und ventrikelspezifischer Veränderungen des myokardialen  $\beta$ -adrenergen Systems im Modell der MCT-induzierten rechtsventrikulären Hypertrophie bzw. Insuffizienz. Zusammenfassend wurden drei Entwicklungsstadien der rechtsventrikulären Hypertrophie aufgezeigt. Das Stadium der RHH-Vorstufe, 7-10 Tage nach MCT-Applikation, zeigte keine Anzeichen einer rechtsventrikulären Hypertrophie, und bis auf eine Reduktion der rechtsventrikulären  $\beta$ -AR-Dichte, keine Veränderungen der gemessenen Parameter bei den MCT-behandelten Tieren im Vergleich mit den altersentsprechenden Kontrolltieren. Das Zeitintervall II, 13-19 Tage nach MCT-Behandlung ist gleichzusetzen mit der Entwicklungsstufe einer milden/leichten rechtsventrikulären Hypertrophie. Durch die Analyse der Körper-, Organ- und Ventrikelgewichte wurde die Ausbildung einer RHH nachgewiesen, jedoch weiterhin ohne signifikante Veränderungen in der pNA-Konzentration, der rechtsventrikulären  $\beta$ -AR-Dichte, der NAT-Dichte und -Aktivität sowie der GRK-Aktivität bei den MCT-behandelten Tieren. Einzig ein signifikanter Abfall der  $E_{\max}$ -Werte bei der NA-induzierten Kontraktion der Arteria pulmonalis im Vergleich mit der Kontrollgruppe konnte in diesem Stadium der rechtsventrikulären Hypertrophie beobachtet werden. Innerhalb von 21-28 Tagen nach MCT-Behandlung (Gruppe III) bildete sich eine schwerwiegende rechtsventrikuläre Hypertrophie aus, die verbunden war mit signifikanten Veränderungen aller gemessener Parameter bei den MCT-behandelten Tieren. In diesem Stadium der Krankheitsentwicklung war bei der Mehrheit der MCT-behandelten Tiere, neben den aufgezeigten Effekten im sympathoadrenergen System, die Manifestation ausgeprägter klinischer Symptome bzw. Organveränderungen, wie Dyspnoe, Aszitis, Pleuraergüsse, Stauungszeichen in Lunge und in der Leber zu beobachten.

Die linksventrikulären Parameter unterschieden sich in allen drei Zeitintervallen jedoch nur marginal von denen der Kontrollratten. Damit bestätigt sich, dass dieses Modell sehr gut zum Studium einer spezifisch rechtsventrikulären Hypertrophie bzw. Insuffizienz auf dem Boden einer pulmonalen Hypertonie, so wie es bei Patienten mit *Cor pulmonale* gesehen wird, geeignet ist. Darüber hinaus deuten diese ventrikelspezifischen Veränderungen an, dass vorrangig lokale und nicht systemische Mechanismen für die Veränderungen bei chronischer RHH/RHI verantwortlich zu machen sind.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die bei MCT-behandelten Ratten kompensatorisch entwickelte rechtsventrikuläre Hypertrophie per se nicht ausreicht, um die bei diesem Krankheitsbild häufig gesehenen charakteristischen Veränderungen im myokardialen sympathoadrenergen System zu verursachen. Diese können nur entstehen, wenn die ventrikuläre Hypertrophie mit einer neurohumoralen Aktivierung verbunden ist. Dabei scheint vorrangig die Kombination von erhöhter sympathischer Aktivität und

reduzierter neuronaler NA-Wiederaufnahme (Uptake<sub>1</sub>), wie sie in Stadium der schwerwiegenden RHH/RHI demonstriert wurde, zu einer Erhöhung der GRK-Aktivität zu führen und eine Downregulation der  $\beta$ -AR zu bewirken.

<b>Tage nach MCT-Applikation</b>	<b>7-10</b>	<b>13-19</b>	<b>21-28</b>
<b>RHH</b>	$\pm 0$	↑	↑
<b>Plasma-Noradrenalin-Konzentration</b>	$\pm 0$	$\pm 0$	↑
<b><math>\beta</math>-Adrenozeptor-Dichte</b>	↓	$\pm 0$	↓
<b>GRK-Aktivität</b>	$\pm 0$	$\pm 0$	↑
<b>NAT-Dichte</b>	$\pm 0$	$\pm 0$	↓
<b>NAT-Aktivität</b>	$\pm 0$	$\pm 0$	↓
<b>Noradrenalin-induzierte Kontraktion Aorta thoracica</b>	$\pm 0$	$\pm 0$	↓
<b>Noradrenalin-induzierte Kontraktion Arteria pulmonalis</b>	$\pm 0$	↓	↓

**Tabelle 6: Übersicht der Ergebnisse innerhalb der einzelnen untersuchten Entwicklungsstadien der MCT-induzierten rechtsventrikulären Hypertrophie/Insuffizienz im Vergleich zu Kontrollen.**

- Abraham G**, Seyfarth T, Heinroth-Hoffmann I, Brodde OE:  $\beta$ -Adrenoceptors in cardiomyocytes from monocrotalin-treated hearts. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 363 (Suppl.) (2001) 374
- Akhter SA**, Milano CA, Shotwell KF, Cho M-C, Rockman HA, Lefkowitz RJ and Koch WJ: Transgenic mice with cardiac overexpression of  $\alpha_1$ beta-adrenergic receptors: In vivo  $\alpha_1$ -adrenergic receptor-mediated regulation of b-adrenergic signaling. *J Biol Chem* 272 (1997a) 21253–21259
- Akhter SA**, Skaer CA, Kypson AP, McDonald PH, Peppel KC, Glower DD, Lefkowitz RJ and Koch WJ: Restoration of beta-adrenergic signaling in failing cardiac ventricular myocytes via adenoviral-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (1997b) 12100–12105
- Anderson FL**, Port DJ, Reid BB, Larrabee P, Hanson G, Bristow MR: Myocardial catecholamine and neuropeptide Y depletion in failing ventricles of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* 85 (1992) 46-53
- Barger AC**, Roe BB, Richardson GS: Relation of valvular lesions and of exercise to auricular pressure, work tolerance and to development of chronic, congestive failure in dogs. *Am J Physiol* 169 (1952) 384-399
- Beau SL**, Saffitz JE: Transmural heterogeneity of norepinephrine uptake in failing human hearts. *J Am Coll Cardiol* 23 (1994) 579-585
- Behrenbeck DW**: Das chronische Cor pulmonale. In Riecker G: *Handbuch der Inneren Medizin*, Band IV Herzinsuffizienz, 5. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokio, 1984, S.361-395
- Benovic JL**, Mayor F, Staniszewski C, Lefkowitz RJ, Caron MG: Purification and characterization of the beta-adrenergic receptor kinase. *J Biol Chem* 262 (1987) 9026-9032
- Beuckelmann DJ**: Pulmonale Hypertonie. *Internist* 38 (1997) 1020-1033
- Blumenstein M**: Diuretikagabe bei chronischer Herzinsuffizienz. *Internist* 27 (1986) 306-314
- Böhm M**, Gierschick P, Jacobs KH: Increase of  $G_{i\alpha}$  in human hearts with dilated but not ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 82 (1990) 1249-1265
- Böhm M**, La Rosée K, Schwinger RHG, Erdmann E: Evidence for reduction of norepinephrine uptake sites in the failing in human heart. *J Am Coll Cardiol* 25 (1995) 146-153
- Böhm M**, Castellano M, Flesch M, Maach C, Moll M, Paul M, Schiffer F, Zolk O: Chamber-specific alterations of norepinephrine uptake sites in cardiac hypertrophy. *Hypertension* 32 (1998) 831-837
- Böhm M**: Herzinsuffizienz. Thieme, Stuttgart, 2000, S.21-23, S. 82-89



- Bradford MM:** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal Biochem.* 72 (1976) 248-254
- Braunwald E:** Heart Failure. In Wilson J et al. (Hrsg): *Harrison's Principles of Internal Medicine*. McGraw-Hill, Inc., New York, 1991, S. 890-902
- Braunwald E, Bristow MR:** Congestive heart failure: Fifty years of progress. *Circulation* 102 (2000) IV14-IV23
- Braunwald E, Zipes DP, Libby P:** Heart Disease; A Textbook of Cardiovascular Medicine. 6th Edition, WB Saunders Company, Philadelphia, 2001, S. 520-524; 584-590
- Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, Cubicciotti RS, Sageman WS, Lurie K, Billingham ME, Harrison DC, Stinson EB:** Decreased catecholamine sensitivity and  $\beta$ -adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med* 307 (1982) 205-211
- Bristow MR,** The adrenergic nervous system in heart failure. *N Engl J Med* 311 (1984) 850-850
- Bristow MR, Ginsburg R, Umans R, Fowler M, Minobe W, Rasmussen R, Zera P, Menlove R, Shah P, Jamieson S, Stinson EB:**  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenergic-receptor subpopulations in normal and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective  $\beta_1$ -receptor down-regulation in heart failure. *Circ Res* 59 (1986) 297-309
- Bristow MR, Hershberger RE, Port JD, Minobe W, Rasmussen R:**  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenergic receptor-mediated adenylate cyclase stimulation in non failing and failing human ventricular myocardium. *Mol Pharmacol* 35 (1989) 295-303
- Bristow MR, Minobe W, Rasmussen R, Larrabee P, Skerl L, Klein JW, Anderson FL, Murray J, Mestroni L, Karwande SV, Fowler M, Ginsburg R:**  $\beta$ -adrenergic neuroeffector abnormalities in the failing human heart are produced by local rather than systemic mechanisms. *J Clin Invest* 89 (1992) 803-815
- British Medical Research Council Domiciliary Study:** Long term domiciliary oxygen therapy in chronic hypoxic cor pulmonale complicating chronic bronchitis and emphysema. *Lancet* 1(8222) (1981) 681-686
- Brodde O-E:**  $\beta_1$  and  $\beta_2$  adrenoceptors in the human heart: properties, function and alterations in chronic heart failure. *Pharmacol Rev* 43 (1991) 203-242
- Brodde O-E, Hillman S, Kunde K, Vogelsang M, Zerkowski HR:** Receptor systems affecting force of contraction in the human heart and their alterations in chronic heart failure. *J Heart Lung Transplant* 11 (1992) 164-S174

- Brodde O-E**, Michel MC, Zerkowski HR: Signal transduction mechanisms controlling cardiac contractility and their alterations in chronic heart failure. *Cardiovasc Res* 30 (1995) 570-548
- Brodde O-E**, Konschak U, Becker K, Rüter F, Poller U, Radke J, Zerkowski HR: Cardiac muscarinic receptors decrease with age. In vitro and in vivo studies. *J Clin Invest* 101 (1998) 471-478
- Brodde O-E**, Michel MC: Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol Rev* 51 (1999) 651-689
- Brodde O-E**, Bruck H, Leineweber K, Seyfarth T: Presence, distribution and physiological function of adrenergic and muscarinic receptor subtypes in the human heart. *Basic Res Cardiol* 96 (2001) 528-538
- Brown L**, Miller J, Dagger A, Conrad S: Cardiac and vascular responses after monocrotaline-induced hypertrophy in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 31 (1998) 108-115
- Cargill RI**, Lipworth BJ: Atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide in cor pulmonale. *Chest* 110 (1996) 1220-1225
- Cecconi C**, Condorelli E, Quinzanini m, Rodella A, Ferrari R, Harris P: Noradrenaline, atrial natriuretic peptide, bombesin and neurotensin in myocardium and blood of rats in congestive cardiac failure. *Cardiovasc Res* 23 (1989) 674-682
- Cerbai E**, Guerra L, Varani K, Barbieri M, Borea PA, Mugelli A:  $\beta$ -Adrenoceptor subtypes in young and old rat ventricular myocytes: a combined patch-clamp and binding study. *Br J Pharmacol* 116 (1995) 1835-1842
- Cheng Y**, Prusoff WH: Relationship between the inhibition constant ( $K_i$ ) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition ( $IC_{50}$ ) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 22(23) (1973) 3099-3108
- Chidsey CA**, Harrison DC, Braunwald E: Augmentation of the plasma norepinephrine response to exercise in patients with congestive heart failure. *N Engl J Med* 267 (1962) 650-654
- Chidsey CA**, Braunwald E, Morrow AG: Catecholamine excretion and cardiac stores of norepinephrine in congestive heart failure. *Am J Med* 39 (1965) 442-451
- Chidsey CA**, Braunwald E: Sympathetic activity and neurotransmitter depletion in congestive heart failure. *Pharmacol Rev* 18 (1966) 685-700
- Choi DJ**, Koch WJ, Hunter JJ, Bockmann HA: Mechanism of  $\beta$ -adrenergic receptor desensitization in cardiac hypertrophy is increased  $\beta$ -adrenergic receptor kinase. *J Biol Chem* 272 (1997) 17223-17229

- Cohn JN**, Levine TB, Olivari MT, Garberg V, Lura D, Francis GS, Simon AB, Rector T: Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med* 311 (1984) 819-823
- Cohn JN**: The sympathetic nervous system in heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 14 Suppl.5 (1989) 57-61
- Cohn JN**, Tognoni G: For the Valsartan Heart Failure Trial Investigators. A randomised trial of the angiotensin-receptor blocker Valsartan in chronic heart failure. *N Engl J Med* 345 (2001) 1667-1675
- Comini L**, Gaia G, Curello S, Ceconi C, Pasini E, Benigno M, Bachetti T, Ferrari R: Right heart failure chronically stimulates heat shock protein 72 in heart and liver but not in other tissues. *Cardiovasc Res* (1996) 882-890
- Corti R**, Binggeli C, Sudano I, Spieker LE, Wenzel RR, Lüscher TF, Noll G: The beauty and the beast: aspects of the autonomic nervous system. *News Physiol Sci* 15 (2000) 125-129
- De Blasi A**, Parruti G, Sallese M: Regulation of G protein- coupled receptor kinase subtypes in activated T lymphocytes. Selective increase of [ $\beta$ ]-adrenergic receptor kinase 1 and 2. *J Clin Invest* 95 (1995) 203-210
- Delehanty JM**, Himura Y, Elam H, Hood WB, Liang CS:  $\beta$ -adrenoceptor downregulation in pacing-induced heart failure with increased intestinal NE content *Am J Physiol* 266 (1994) H930-H935
- Dhein S**, Giessler C, Becker K, Pönicke K, Brodde OE: Inositolphosphate formation in thoracic and abdominal rat aorta following  $G_{q/11}$ -coupled receptor stimulation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 363 (2001) 322-329
- Dhein S**, Giessler C, Heinroth-Hoffmann I, Leineweber K, Seyfarth T, Brodde OE: Changes in  $\alpha_1$ -adrenergic vascular reactivity in monocrotaline-treated rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 365 (2002) 87-95
- Dietz R**: Herzinsuffizienz. Springer, Berlin, 1992
- Doggrell SA**, Brown L: Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res* 39 (1998) 89-105
- Dong E**, Yatani A, Mohan A, Liang CS: Myocardial  $\beta$ -adrenoceptor down-regulation by norepinephrine is linked to reduced norepinephrine uptake activity. *Eur J Pharmacol* 384 (1999) 17-24
- Dooley DJ**, Bittiger H, Reymann NC: CGP 20712A: a useful tool for quantitating  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* 130 (1986) 137-139

- Elenkov IJ**, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES: The sympathetic nerve – an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev* 52 (2000) 595-638
- Erdmann E**: Herzinsuffizienz. Ursachen, Pathophysiologie und Therapie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1995, S. 53-80, 160-187
- Fagura MS**, Lydford SJ, Dougall IG: Pharmacological classification of  $\alpha_1$ -adrenoceptors mediating contractions of rabbit isolated ear artery: comparison with rat isolated thoracic aorta. *Br J Pharmacol* 120 (1997) 247-258
- Fan MTH**, Liang CS, Kawashima S, Banerjee S: Alterations in cardiac  $\beta$ -adrenoceptor responsiveness and adenylate cyclase system by congestive heart failure in dogs. *Eur J Pharmacol* 140 (1987) 123-132
- Floras JS**: The “unsympathetic” nervous system of heart failure. *Circulation* 105 (2002) 1753-1755
- Forth W**, Henschler D, Rummel W, Starke K: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 6.Aufl., BI-Wissenschaftsverlag, Mannheim, Leipzig Wien (usw.), 1992 S.109-111
- Francis GS**, Cohn JN: The autonomic nervous system in congestive heart failure. *Annu Rev Med* 37 (1996) 235-247
- Freedman NJ**, Liggett SB, Drachmann DE, Pel G, caron MG, Lefkowitz RJ,: Phosphorylation and desensitization of the human  $[\beta]_1$ -adrenergic receptor: Involvement of GRKs and cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 270 (1995) 17953-17961
- Freissmuth M**, Hausleithner V, Nees S, Böck M, Schütz W: Cardiac ventricular  $\beta_2$ -adrenoceptors in guinea pigs and rats are located on the coronary endothelium. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 334 (1986) 56-62
- Gerdes AM**, Kellermann SE, Moore JA: Structural remodeling of cardiac myocytes from patients with chronic ischemic heart disease. *Circulation* 86 (1992) 426-430
- Ghods F**, Will JA: Changes in pulmonary structure and function induced by monocrotaline intoxication. *Am J Physiol* 240 (1981) H149-H155
- Goldstein DS**, Brush JE Jr, Eisenhofer G, Stull R, Esler M: In vivo measurement of neuronal uptake of norepinephrine in the human heart. *Circulation* 78(1) (1988) 41-48
- Griebenow R** & Hauch HJ: Cor pulmonale. In Hornbostel H, Kaufmann W, Siegenthaler W: Innere Medizin in Praxis und Klinik. Band I. 4. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1992, S. 312-328

- Griner GJ:** Effects of long-term oxygen therapy on mortality and morbidity. *Respir Care* 45 (2000) 105-117
- Gros R,** Benovic JL, Tan CM, Feldman RD: G-Protein-coupled receptor kinase activity is increased in hypertension. *J Clin Invest* 99 (1997) 2087-2093
- Grossmann W,** Jones D, McLaurin LP: Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest* 56 (1974) 56-64
- Hammer O:** Measures and figures in the diagnosis and therapy of chronic cor pulmonale. *Munch Med Wochenschr* 113(45) (1971) 1512-1516
- Hasking GJ,** Esler MD, Jennings GL, Burton D, Korner PI: Norepinephrine spillover to plasma in patients with congestive heart failure: evidence of increased overall and cardiorenal sympathetic nervous activity. *Circulation* 73 (1986) 615-621
- Hellige G,** Spieckermann PG, Baumann G: *Herzinsuffizienz-Fortschritte in Diagnostik und Therapie.* Arcis, München, 1994
- Herberg G,** Geisler I, Dengler HJ, Wagner F: Spastische Emphysebronchitis und chronisches Cor pulmonale. *Dtsch Med Wochenschr* 89 (1964) 1702
- Higgins CB,** Pavelec R, Vatner SF: Modified technique for production of experimental right-sided congestive heart failure. *Cardiovasc Res* 7 (1973) 870-874
- Hilliker KS,** Roth RA: Increased vascular responsiveness in lung of rats with pulmonary hypertension induced by monocrotaline pyrrol. *Am Rev Respir Dis* 131 (1985) 46-50
- Himura Y,** Felten S, Kashiki K, Lewandowski TJ, Delehanty LM, Liang CS: Cardiac noradrenergic nerve terminal abnormalities in dogs with experimental congestive heart failure. *Circulation* 88 (1993) 1299-1309
- Hosenpud JD,** Bennett LE, Keck BM, Fiol B, Boucek MM, Novick RJ: The registry of the international society for heart and lung transplantation: sixteenth official report-1999. *J Heart Lung Transplant* 18 (1999) 611-626
- HunterJJ,** Tanaka N, Rockman HA, Ross J Jr, Chien KR: Ventricular expression of a MLC-2v-ras fusion gene induces cardiac hypertrophy and selective diastolic dysfunction in transgenic mice. *J Biol Chem* 270 (1995) 23173-23178
- Hussain MB,** Marshall I: Characterization of alpha1-adrenoceptor subtypes mediating contractions to phenylephrine in rat thoracic aorta, mesenteric artery and pulmonary artery. *Br J Pharmacol* 122 (1997) 849-858
- Iaccarino G,** Tomhave ED, Lefkowitz RJ, Koch WJ: Reciprocal in vivo regulation of myocardial G protein-coupled receptor kinase expression by  $\beta$ -adrenergic receptor stimulation and blockade. *Circulation* 98 (1998) 1783-1789

- Iaccarino G**, Dolber CD, Lefkowitz RJ, Koch WJ:  $\beta$ -adrenergic receptor kinase-1 levels in catecholamine-induced myocardial hypertrophy. *Hypertension* 33 (1999) 396-401
- Iaccarino G**, Koch WJ: Therapeutic potential of G-protein coupled receptor kinases in the heart. *Exp Opin Invest Drugs* 8 (1999) 545-554
- Inglese J**, Freedman NJ, Koch WJ, Lefkowitz RJ: Structure and mechanism of the G protein coupled receptor kinases. *J Biol Chem* 268 (1993) 23735-23738
- Ishikawa S**, Honda M, Yamada S, Morioka S, Moriyama K: Biventricular down-regulation of  $\beta$ -adrenergic receptors in right ventricular hypertrophy induced by monocrotaline. *Japan Circ J* 55 (1991) 1077-1085
- Ito KM**, Sato M, Ushijima K, Nakai M, Ito K: Alterations of endothelium and smooth muscle function in monocrotaline-induced pulmonary hypertensive arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279 (2000) H1786-H1795
- Iversen LL**: The uptake of catecholamines at high perfusion concentrations in the rat isolated heart: a novel catecholamine uptake process. *Brit J Pharmacol* 25 (1965) 18-33
- Kanai Y**, Hori S, Tanaka T, Yasuoka M, Watanabe K, Aikawa N, Hosoda Y: Role of 5-hydroxytryptamine in the progression of monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Cardiovasc Res* 27 (1993) 1619-1623
- Katz AM**: Cardiomyopathy of overload. *N Eng J Med* 322 (1990) 100-110
- Kawai H**, Fan TH, Dong E, Siddiqui RA, Yatani A, Stevens SY, Liang CS: ACE inhibition improves cardiac NE uptake and attenuates sympathetic nerve terminal abnormalities in heart failure. *Am J Physiol* 277 (1999) H1609-1617
- Kay JM**, Harris P, Heath D: Pulmonary hypertension in rats produced by the ingestion of *Crotalaria spectabilis* seeds. *Thorax* 22 (1967) 176-179
- Kay JM**, Heath D: *Crotalaria spectabilis the pulmonary hypertension plant*. Springfield: C.C. Thomas (1969)
- Koch WJ**, Inglese J, Stone WC, Lefkowitz RJ: The binding site for the beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins on the beta-adrenergic receptor kinase. *Biol Chem* 15 (1993) 8256-8260
- Konstantinides S & Hasenfuß G**: Akutes Cor pulmonale bei Lungenembolie. Entscheidener prognostischer Faktor und kritischer Parameter für die Auswahl der therapeutischen Strategie. *Der Internist* 55 (2004) 1155-1162
- Krupnick JG**, Benovic JL: The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol* 38 (1998) 289-319

- Kuznetsov V**, Pak E, Robinson RB, Steinberg SF:  $\beta_2$ -Adrenergic receptor actions in neonatal and adult rat ventricular myocytes. *Circ Res* 76 (1995) 40-52.
- Laemmli UK**: Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (1970) 680-685
- Lai LP**, Suematsu M, Elam H, Liang CS: Differential changes of myocardial  $\beta$ -adrenoceptor subtypes and G-proteins in dogs with right-sided congestive heart failure. *Eur J Pharmacol* 309 (1996) 201-208
- Langleben D**, Szarek JL, Coflesky JT, Jones RC, Reid LM, Evenas JN: Altered artery mechanics and structure in monocrotaline pulmonary hypertension. *J Appl Physiol* 65 (1988) 2326-2331
- Lasch HG**, Nolte D: Chronic cor pulmonale. *Wien Klin Wochenschr* 83(33) (1971) 595-599
- Lau YH**, Robinson RB, Rosen MR, Bilezikian JP: Subclassification of  $\beta$ -adrenergic receptors in rat cardiac myoblasts and fibroblasts. *Circ Res* 47 (1980) 41-48
- Lasch HG**, Nolte D: Chronisches Cor pulmonale. *Wien Klin Wochenschr* 83 (1971) 595
- Lefkowitz RJ**, Caron MC, Stiles GI: Mechanism of membrane-receptor regulation. *N Engl J Med* 24 (1984) 1570-1579
- Lefkowitz RJ**: G protein-coupled receptor kinase. *Cell* 74 (1993) 409-412
- Leineweber K**, Seyfarth T, Brodde OE: Chamber specific alterations of noradrenaline uptake (uptake<sub>1</sub>) in right ventricles of monocrotaline-treated rats. *Br J Pharmacol* 131 (2000) 1438-1444
- Leineweber K**, Brandt K, Wludyka B, Beilfuß A, Pönicke K, Heinroth-Hoffman I, Brodde OE: Ventricular hypertrophy plus neurohumeral activation is necessary to alter the cardiac  $\beta$ -adrenoceptor system in experimental heart failure. *Circ Res* 91 (2002a) 1056-1062
- Leineweber K**, Heinroth-Hoffmann I, Pönicke K, Abraham G, Osten B, Brodde OE: Cardiac [beta]-adrenoceptor desensitization due to increased [beta]-adrenoceptor kinase activity in chronic uremia. *J Am Soc Nephrol* 13 (2002b) 117-124
- Leineweber K**, Seyfarth Thorsten, Abraham G, Gerbershagen HP, Heinroth-Hoffmann I, Pönicke K, Brodde OE: Cardiac  $\beta$ adrenoceptor changes in monocrotaline-treated rats: Differences between membrane preparations from whole ventricles and isolated ventricular cardiomyocytes. *J Cardiovasc Pharmacol* 41 (2003) 333-342
- Levine TB**, Francis GS, Goldsmith SR, Simon AB, Cohn JN: Activity of the sympathetic nervous system and rennin-angiotensin system assessed by plasma hormone levels and their relationship to hemodynamic abnormalities in congestive heart failure. *Am J Cardiol* 49 (1982) 1659-1666

- Liang CS**, Fan THM, Sullebarger JT, Sakamoto S: Decreased adrenergic neuronal uptake activity in experimental heart failure. *J Clin Invest* 84 (1989) 1267-1275
- Liang CS**, Frantz RP, Suematsu M, Sakamoto S, Sullebarger JT, Fan THM, Guthinger L: Chronic  $\beta$ -adrenoceptor blockade prevents the development of  $\beta$ -adrenergic subsensitivity in experimental right-sided congestive heart failure in dogs. *Circulation* 84 (1991) 254-266
- Mahajan SK**, Sharma VK, Thakral S: Effect of enalapril on renal profile and right ventricular dimensions in chronic cor pulmonale. *J Assoc Physicians India* 44 (1996) 323-324
- Matthes T**: Pathophysiological problems with regard to lung resection. *Zentralbl Chir* 86 (1961) 319-327
- Mattocks AR**, White INH: The conversion pyrrolizidine alkaloids to N-oxides and to dihydroxypyrrolizine derivatives by rat liver microsomes in vitro. *Chem. Biol Interact* 3 (1971) 383-396
- Molenaar P**, Canale E, Summers RJ: Autoradiographic localization of beta-1 and beta-2 adrenoceptors in guinea-pig atrium and regions of the conducting systems. *J Pharmacol Exp Ther* 241 (1987) 1048-1064
- Molenaar P**, Jones CR, McMartin LR, Summers RJ: Autoradiographic localization and densitometric of beta-1 and beta-2 adrenoceptors in the canine left anterior descending coronary artery. *J Pharmacol Exp Ther* 246 (1988) 384-393
- Motulsky HJ**: The Graphpad guide to: Analysing radioligand binding data (booklet). GraphPad Software Inc. San Diego. USA (1996)
- Motulsky HJ**, Insel PA: Adrenergic receptors in man. Direct identification, physiologic regulation and clinical alterations. *N Engl J Med* 307 (1982) 18-29
- Morioka S**, Honda M, Ishikawa S, Ishinaga Y, Yano S, Tanaka K, Moriyama K: Changes in contractile and non-contractile proteins, intracellular  $Ca^{2+}$  and ultrastructures during the development of right ventricular hypertrophy and failure in rats. *Jpn Circ J* 56 (1992) 469-474
- Murders F**, Elsner D: Animal models of chronic heart failure. *Pharmacol Res* 41 (2000) 605-612
- Neumann J**, Schmitz W, Meyerinck L von, Scholz H, Döring V, Kalmar P: Increase in myocardial  $G_i$ -proteins in heart failure. *Lancet* 2 (1988) 936-937
- Nocturnal Oxygen Clinical Trial Group**: Continuous or nocturnal oxygen therapy in hypoxemic chronic obstructive lung disease; a clinical trial. *Ann Intern Med* 93 (1980) 391
- Orth M**, Rasche K, Schultze-Werninghaus G: Chronisches Cor pulmonale. *Epidemiologie, Pathophysiologie und Klinik. Der Internist* 40 (1999) 722-728



- Pan LC**, Lame MW, Morin D, Wilson DW, Segall HJ: Red blood cells augment transport of reactive metabolites of monocrotaline from liver to lung in isolated and tandem liver and lung preparation. *Toxicol Appl Pharmacol* 110 (1991) 336-346
- Paris W**, Woodbury A, Thompson S: Returning to work after heart-transplantation. *J Heart Lung Transplant* 12(Pt 1) (1993) 46-53
- Pela G**, Missale C, Raddino R, Condorelli E, Spano PF, Visioli O:  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -receptors are differentially desensitized in an experimental model of heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 16 (1990) 839-846
- Penn RB**, Pronin AN, Benovic JL: Regulation of G protein-coupled receptor kinases. *Trends Cardiovasc* 10 (2000) 81-89
- Petch MC**, Nayler WG: uptake of catecholamines by human cardiac muscle in vitro. *Br Heart J* 41 (1979) 336-339
- Pierport GL**, Francis GS, DeMaster EG, Olivari MT, Ring WS, Goldenber PF, Reynolds S, Cohn JS: Heterogeneous myocardial catecholamine concentrations in patients with congestive heart failure. *Am J Cardiol* 60 (1987) 316-321
- Pitcher JA**, Freedmann NJ, Lefkowitz RJ: G protein-coupled receptor kinases. *Annu Rev Biochem* 67 (1998) 653-692
- Pitt B**, Zannad F, Remme WJ: The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. *N Engl J Med* 341 (1999) 709-717
- Pitt B**, Poole-Wilson PA, Segal R: Effect of losartan compared with captopril on mortality in patients with symptomatic heart failure: randomised trial-the Losartan Heart failure Survival Study ELITE I. *Lancet* 355 (2000) 1582-1587
- Port JD**, Gilbert EM, Larrabee P, Mealey P, Volkmann K, Ginsburg R, Hershberger RE, Bristow MR: Neurotransmitter depletion compromises the ability of indirect acting amines to provide inotropic support in the failing human heart. *Circulation* 81 (1990) 929-938
- Premont, R. T.**, Koch, W. J., Inglese, J., and Lefkowitz, R. J: *J Biol Chem.* 269 (1994) 6832–6841
- Rang HP**, Dale MM, Ritter JM, Moore PK: *Pharmacology*, 5th Edition, Churchill Livingstone/Elsevier Science Limited, Edinburgh, 2003, S. 161-182
- Rector TS**, Olivari MT, Levine B, Francis GS, Cohn JN: Predicting survival for an individual with congestive heart failure using the plasma norepinephrine concentration. *Am Heart J* 114 (1987) 148-152

- Reindell H**, Doll E, Steim H, Bilger R, Gebhardt W, Emmerich J, Büchner Chr, Schwilden E,: Zur Pathophysiologie der pulmonalen Hypertonie und des chronischen Cor pulmonale. Arch Kreisl Forschg 43 (1964) 1
- Reissner AH**, Nemes P, Buchholtz C: The use of Coomassie brilliant blue G-250 perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focussing on polyacrylamide gels. Anal Biochem 64 (1975) 509-516
- Richardson P**, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, Olsen E, Thiene G: Report of the 1995 World health Organisation/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies. Circulation 93 (1996) 841-842
- Rockman HA**, Chien KR, Choi DJ, Iaccarino G, Hunter JJ, Ross JJr, Lefkowitz RJ, Koch WJ: Expression of a beta adrenergic receptor kinase 1 inhibitor prevents the development of myocardial failure in gene-targeted mice: Pro Natl Acad Sci USA 95 (1998) 7000-7005
- Rose CP**, Burgess JH, Cousineau D: Reduced aortocoronary sinus extraction of epinephrine in patients with left ventricular failure secondary to long-term pressure or volume overload. Circulation 68 (1983) 241-244
- Rosenberg HC**, Rabinovitch M: Endothelial injury and vascular reactivity in monocrotaline pulmonary hypertension. Am J Physiol 255 (1988) H1484-H1491
- Ryden L**, Remme WJ: Treatment of congestive heart failure. Eur Heart J 20 (1999) 867-871
- Sandoval AB**, Gilbert EM, Rose CP, Bristow MR: Cardiac norepinephrine uptake and release is decreased in dilated cardiomyopathy. Circulation 80 (1989) 393
- Scatchard G**: The attractions of proteins for small molecules and ions. Ann NY Acad Sci 51 (1949) 660-672
- Schäfers RF**, Poller U, Pönicke K, Geissler M, Daul AE, Michel MC, Brodde O-E: Influence of adrenoceptor and muscarinic receptor blockade on the cardiovascular effects of exogenous noradrenaline and of endogenous noradrenaline released by infused tyramine. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol 355 (1997) 239-249
- Schwinger RHG**: Therapie der chronischen Herzinsuffizienz mit Diuretika. In Erdmann E: Herzinsuffizienz. Ursachen, Pathophysiologie und Therapie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1995, S. 139-158
- Seyfarth T**, Gerbershagen HP, Giessler C, Leineweber C, Heinroth-Hoffmann I, Pönicke K, Brodde OE: The cardiac  $\beta$ -adrenoceptor-G-protein(s)-adenyl cyclase system in monocrotaline-treated rats. J Mol Cell Cardiol 32 (2000) 1-12

- Shearman LP**, Meyer JS: Norepinephrine transporters in rat placenta labeled with [<sup>3</sup>H]Nisoxetine. *J Pharmacol Exp Ther* 284 (1997) 736-743
- Spann JF Jr**, Buccino RA, Sonnenblick EH: Contractile state of cardiac muscle obtained from cats with experimentally produced ventricular hypertrophy and heart failure. *Circ Res* 21 (1967) 341-354
- Steinberg SF**: The molecular basis for distinct  $\beta$ -adrenergic receptor subtype actions in cardiomyocytes. *Circ Res* 85 (1999) 1001-1111
- Summers RJ**, McMartin LR: Adrenoceptors and their second messenger systems. *J Neurochem* 60 (1993) 10-23
- Swedberg K**, Viquerat C, Rouleau JL, Roizen M, Atherton B, Parmley WW, Chatterjee K: Comparison of myocardial catecholamine balance in chronic congestive heart failure and in angina pectoris without failure. *Am J Cardiol* 54 (1984) 783-786
- Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure**, European Society of Cardiology: Remme WJ, Swedberg K: Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure. *Eur Heart J* 22 (2001) 1527-1560
- Tatabe S**, Miyamura H, Sugawara MA, Watanabe H, Eguchi S: Induction of right ventricular hypertrophy in neonatal guinea pigs by monocrotaline. *Jpn Circ J* 60 (1996) 604-608
- Teucher E**, Lindequist U: Biogene Gifte. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York, 2. Aufl., 1994, S.440-443
- Tejani-Butt SM**: [<sup>3</sup>H]-Nisoxetine: a radioligand for quantitation of norepinephrine uptake sites by autoradiography or by homogenate binding. *J Pharmacol Exp Ther* 260 (1992) 427-436
- Testa R**, Guarneri L, Pogessi E, Simonazzi I, Taddei C, Leonardi A: Mediation of noradrenaline induced contraction of rat aorta by the  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptor subtype. *Br J Pharmacol* 114 (1995a) 745-750
- Testa R**, Destefani C, Guarneri I, Pogessi E, Simonazzi I, Taddei C, Leonardi A: The  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptor subtype is involved in the noradrenalin-induced contractions of rat aorta. *Life Sci* 577 (1995b) PL159-163
- The British Medical Research Council Domiciliary Study**: Long term domiciliary oxygen therapy in chronic hypoxic cor pulmonale complicating chronic bronchitis and emphysema. *Lancet* 1 (1981) 681
- The European Society of Cardiology**: The EuroHeart Failure Survey programme-a survey on the quality of care among patients with heart failure in Europe: Part 2: treatment. *Eur Heart J* 24 (2003) 464-475

- The CONSENSUS Trial study group:** Effects of Enalapril on mortality in severe congestive heart failure. *N Engl J Med* 316 (1987) 1429-1435)
- Thomas JA, Marks BH:** Plasma norepinephrine in congestive heart failure. *Am J Cardiol* 41 (1978) 233-243
- Trendelenburg U:** Functional aspects of the neuronal uptake of noradrenaline. *Trends in Pharmacological Science* 12 (1991) 334-337
- Trendelenburg U, Weiner N:** Catecholamines I. *Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer, Berlin, Vol. 90/I, 1988, S. 4-15, 321-355
- Trendelenburg U, Weiner N:** Catecholamines II. *Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer, Berlin, Vol. 90/ II, 1989, S. 4-6, 351-355
- Ungerer M, Böhm M, Elce JS, Erdmann E, Lohse MJ:** Altered expression of [beta]-adrenergic receptor kinase and [beta]<sub>1</sub>-adrenergic receptors in the failing human heart. *Circulation* 87 (1993) 454-463
- Ungerer M, Parruti G, Böhm M, Puzicha M, DeBlasi A, Erdmann E, Lohse MJ:** Expression of beta-arrestins and beta adrenergic receptor kinases in the failing human heart. *Circ Res* 74 (1994) 206-213
- Ungerer M, Chlistalla A, Richardt G:** Upregulation of cardiac uptake<sub>1</sub> carrier in ischemic and nonischemic heart. *Circ Res* 78 (1996a) 1037-1043
- Ungerer M, Kessebohm K, Kronsbein K, Lohse MJ, Richardt G:** Activation of β-adrenergic receptor kinase during myocardial ischemia. *Circ Res* 79 (1996b) 455-460
- Urasawa K, Yoshida I, Takagi C, Onozuka H, Mikami T, Kawagushi H, Kitabatake A:** Enhanced expression of beta adrenergic receptor kinase 1 in the hearts of cardiomyopathic syrian hamsters. *Biochem Biophys Res Commun* 219 (1996) 26-30
- Uzzaman M, Honjo H, Takagishi Y, Emdad L, Magee AI, Severs NJ, Kodama I:** Remodeling of gap junctional coupling in hypertrophied right ventricles of rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circ Res* 86 (2000) 871-878
- Uretsky BF, Young JB, Eden F, Shahidi F, Yellen LG, Harrison MC, KingJolly M on behalf of the PROVED Investigate Group:** Randomized study assessing the effect of digoxin withdrawal in patients with mild to moderate chronic congestive heart failure. Results of the PROVED trial. *J Am Coll Cardiol* 22 (1993) 955-962
- Vescovo G, Jones SM, Harding SE, Poole-Wilson PA:** Isoproterenol sensitivity of isolated cardiac myocytes from rats with monocrotalin-induced right-sided hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell* 1 (1989) 1047-1061

- Villalobos-Molina R**, Ibarra M:  $\alpha_1$ -Adrenoceptors mediate contraction in arteries of normotensive and spontaneously hypertensive rats are of the  $\alpha_{1D}$  and  $\alpha_{1A}$  subtypes. *Eur J Pharmacol* 298 (1996) 257-263
- Vinge LE**, Oie E, Andersson Y, Grogard HK, Andersen G, Attramadal H: Myocardial distribution and regulation of GRK and beta-arrestin isoforms in congestive heart failure in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 28 (2001) H2490-2409
- Vogt P**, Ruttner JR: Pathologic anatomy of cor pulmonale. Results of autopsies. *Schweiz Med Wochenschr* 107 (1977) 549-553
- Wang X**, Ke H, Wang H: A clinicopathological analysis in 46 elderly cases with cor pulmonale. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 20(4) (1997) 228-230
- Wahnraath D**, Grimminger F, Seeger W: Lungen- und Atemwegserkrankungen. In: Classen M, Diehl V, Kochsiek K (Hrsg): *Innere Medizin*. 4.Aufl. Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, 1998, S. 1437-52
- Wanstall JC**, O'Donnell SR: Endothelin and 5-hydroxytryptamine on rat pulmonary artery in pulmonary hypertension. *Eur J Pharmacol* 176 (1990) 159-168
- Wanstall JC**, O'Donnell SR, Kay CS: Increased relaxation by felodipine on pulmonary artery from rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension does not reflect functional impairment of the endothelium. *Pulm Pharmacol* 4 (1991) 60-66
- Werchan PM**, Summer WR, Gerdes AM, Mc Donough K: Right ventricular performance after monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Am J Physiol* 256 (1989) H1328-H1336
- Williams LT**, Lefkowitz RJ: Receptor binding studies in adrenergic pharmacology. Raven Press, New York 1978
- Wilson DW**, Segall HJ, Pan LCW, Dunsten SK: Progressive inflammatory and structural changes in the pulmonary vasculature of monocrotaline-treated rats. *Microvasc Res* 38 (1989) 57-80
- Wood P**: Disease of the heart and circulation. 2th Edition, Eyre and Spottiswood Lipincott, London, Philadelphia, 1956
- World Health Organisation**: Definition of chronic cor pulmonale: a report of the expert committee. *Circulation* 27 (1963) 594-615
- World Health Organisation**: Definition of heart failure: (1995)
- Xiao RP**, Tomhave ED, Wang DJ, Xiangwu J, Boluyt MO, Cheng H, Lakatta EG, Koch WJ: Age-associated reductions in cardiac  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenergic responses without changes in inhibitory G proteins or receptor kinases. *J Clin Invest* 101 (1998) 1273-1282.

**Xu K**, Han C: Quantification of mRNAs for three  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes in rat aorta by solution hybridisation. *Life Sci* 59 (1996) 343-347

**Yang M**, Ruan J, Voller M, Schalken J, Michel MC: Differential regulation of human alpha1-adrenoceptor subtypes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 359 (1999) 439-446

**Yan CC**, Huxtable RJ: The relationship between the concentration of the pyrrolizidine alkaloid monocrotaline and the pattern of metabolites released from the isolated liver. *Toxicol Appl Pharmacol* 130 (1995) 1-8

**Yoshi H**, Tobise K, Onodera S: Intraventricular changes in the beta-adrenoceptor-adenylate cyclase system of the rat heart with the progress of monocrotaline-induced right ventricular hypertrophy. *Jap Circ J* 58 (1994) 855-865

**Yoshikawa T**, Handa S, Susuki M, Nagami K: Abnormalities in sympathoneuronal regulation are localized to failing myocardium in rabbit heart. *J Am Coll Cardiol* 24 (1994) 210-215

## Thesen

1. Nach Applikation von 50 mg Monocrotalin/kg Körpergewicht bei Ratten konnten drei Entwicklungsstadien der rechtsventrikulären Hypertrophie, mit charakteristischen ventrikelspezifischen Veränderungen kardiovaskulärer Parameter im sympathoadrenergen-System, aufgezeigt werden.
2. Das Stadium der Vorstufe einer rechtsventrikulären Hypertrophie (RHH), 7-10 Tage nach MCT-Applikation, ohne Veränderungen der gemessenen kardiovaskulären Parameter im Vergleich mit den altersentsprechenden Kontrollen.
3. Die Entwicklungsstufe einer milden bzw. leichten RHH, 13-19 Tage nach MCT-Behandlung, mit zunehmenden Symptomen eines pulmonalen Hochdrucks wie Dys- und Tachypnoe, verbunden mit einer signifikanten Hypertrophie des rechten Ventrikels, ohne signifikante Veränderungen in der Plasma-Noradrenalin-Konzentration, der rechtsventrikulären  $\beta$ -AR-Dichte, der NAT-Dichte und -Aktivität und der GRK-Aktivität bei den MCT-Tieren. Einzig eine signifikante Abnahme der Noradrenalin-induzierten Kontraktion der Arteria pulmonalis im Vergleich mit der Kontrollgruppe konnte gezeigt werden.
4. Das Stadium der schwerwiegende RHH mit Rechtsherzinsuffizienz, 21-28 Tage nach MCT-Gabe, verbunden mit einer deutlichen Progression der kardiopulmonalen Beschwerden und typischen Stauungszeichen mit einer Zunahme der Plasma-Noradrenalin-Konzentration, Abnahme der rechtsventrikulären  $\beta$ -AR-Dichte, NAT-Dichte und -Aktivität und der Noradrenalin-induzierten Kontraktion der Arteria pulmonalis und Aorta thoracica sowie einem Anstieg der GRK-Aktivität.
5. Sämtliche linkventrikulär erhobenen Parameter der MCT- Ratten unterschieden sich in allen drei Entwicklungsstadien nur marginal von den Kontrollratten.
6. Das verwendete Tiermodell scheint somit sehr gut zum Studium einer spezifisch rechtventrikulären Hypertrophie/Insuffizienz auf dem Boden einer pulmonalen Hypertonie geeignet zu sein, so wie es bei Patienten mit *Cor pulmonale* gesehen wird.
7. Die aufgezeigten zeitlichen und ventrikelspezifischen Veränderungen deuten darauf hin, dass die bei MCT-Ratten kompensatorisch entwickelte rechtsventrikuläre Hypertrophie per se nicht ausreicht, um die bei diesem Krankheitsbild häufig gesehenen charakteristischen Veränderungen im myokardialen sympathoadrenergen System zu verursachen.
8. Diese können nur entstehen, wenn die ventrikuläre Hypertrophie mit einer neurohumoralen Aktivierung verbunden ist.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Katja Brandt  
Geburtsdatum: 22.05.1979  
Geburtsort: Karlsburg  
Familienstand: ledig, keine Kinder

### Schulbildung:

1985-1989 POS „Werner Lamberz“, Aschersleben  
1989-1991 POS „Ernst Schneller“, Straßberg/Harz  
1991-1997 Gymnasium Harzgerode, Abitur

### Studium:

10/1997-05/2005 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
09/2000 Physikum  
08/2001 1. Staatsexamen  
04/2004 2. Staatsexamen  
05/2004/-03/2005 Praktisches Jahr  
1. Abschnitt: Innere Medizin; BG Kliniken Bergmannstrost Halle/Saale  
2. Abschnitt: Gynäkologie/Geburtshilfe; Paul-Gerhardt-Stiftung Wittenberg  
3. Abschnitt: Unfall- und Wiederherstellungschirurgie; Paul-Gerhardt-Stiftung Wittenberg  
05/2005 3. Staatsexamen  
06/2005 Erlangung der Approbation

### Studienbegleitende Tätigkeiten:

01/1999-11/2003 Studentische Pflegedienste in den Abteilungen Kinderchirurgie, Allgemeinchirurgie und Neurochirurgie (IMC), Universitätsklinikum der MLU Halle-Wittenberg

### Ärztliche Tätigkeit:

seit 10/2005 Assistenzärztin in der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie, Kliniken Erlabrunn



## **Selbständigkeitserklärung**

Ich versichere hiermit die vorliegende Arbeit „Zeitliche und ventrikelspezifische Veränderungen kardiovaskulärer Parameter im sympathoadrenergen System im Monocrotalin-Ratten-Modell der Rechtsherzhypertrophie und -insuffizienz“ selbständig und nur unter Verwendung der von mir angegebenen Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Halle/Saale, 15. August 2007

Katja Brandt

## **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Ich erkläre hiermit, dass die vorliegende Arbeit „Zeitliche und ventrikelspezifische Veränderungen kardiovaskulärer Parameter im sympathoadrenergen System im Monocrotalin-Ratten-Modell der Rechtsherzhypertrophie und -insuffizienz“ zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Medizin (Dr. med.) erstmalig von mir eingereicht wird. Des Weiteren liegen keine anderen Promotionsarbeiten zur Begutachtung an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg oder an einer anderen Universität vor.

Halle/Saale, 15. August 2007

Katja Brandt

## **Publikation**

Teile der vorliegenden Arbeit wurden publiziert in:

Leineweber K, Brandt K, Wludyka B, Beilfuß A, Pönicke K, Heinroth-Hoffman I, Brodde OE: Ventricular hypertrophy plus neurohumeral activation is necessary to alter the cardiac  $\beta$ -adrenoceptor system in experimental heart failure. *Circ Res* 91 (2002) 1056-1062

## Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. rer. nat. Otto-Erich Brodde für die Überlassung des Themas sowie die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in der angenehmen und freundlichen Atmosphäre seines Institutes. Dies ermöglichte mir die freie und ungehinderte Durchführung meiner Experimente auf einem wissenschaftlich hohen Niveau wodurch ich einen sehr guten Einblick in die diffizile Welt der Forschung erlangte.

Besonderer Dank gilt Frau PD Dr. rer. nat. Kirsten Leineweber für ihre Ratschläge in allen praktischen und theoretischen Fragen. Die zahlreichen mit Ihr geführten fachlichen Diskussionen haben wesentlich zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen. Darüber hinaus profitierte ich von ihrer langjährigen Erfahrung im tierexperimentellen Bereich, welche mir den Umgang mit den Versuchstieren wesentlich erleichterte.

Ein ganz herzliches Dankeschön möchte ich Frau Anja Beilfuß für ihre tatkräftige und geduldige Unterstützung beim Erlernen neuer Methoden und der Durchführung der Versuche im Labor aussprechen.

Weiterhin möchte ich mich für die unkomplizierte Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Klaus Pönicke und Frau Christine Giessler bedanken. Sie trugen wesentlich zur Erleichterung meiner Arbeit, durch ihre Unterstützung bei der experimentellen Bestimmung der Plasma-Noradrenalin-Konzentrationen sowie bei der Durchführung der Kontraktionsmessungen an den Gefäßen, der von mir bearbeiteten Versuchstiere, bei.

Für die geduldige und ausdauernde Unterstützung, insbesondere bei allen Problemen im Umgang mit dem Computer bzw. dessen Software und seinen stetigen Ansporn das Ziel nicht aus den Augen zu verlieren, danke ich Herrn Daniel Schmidt.

Mein herzlicher Dank gehört nicht zuletzt meinen Eltern für die immer gewährte großzügige Hilfe auf meinem bisherigem Lebensweg und allen, nicht namentlich erwähnten Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.