

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Direktor: Prof. Dr. O.-E. Brodde

Die Wirkung von Stickstoffmonoxid auf Isoprenalin-induzierte positiv inotrope Effekte beim hypertrophierten Herzen der Ratte

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)
Vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Tilman Wilhelm Weißelberg
geboren am 25. Juli 1969 in Erfurt

Gutachter:

Prof. Dr. Jürgen Holtz, Institut für Pathophysiologie der Universität Halle
Prof. Dr. Eberhard Schlicker, Institut für Pharmakologie der Universität Bonn
Prof. Dr. Otto-Erich Brodde, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der
Universität Halle

02.05.2001,

17.10.2001

urn:nbn:de:gbv:3-000002574

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000002574>]

Referat

Die Erfahrung mehrerer experimenteller Arbeiten hat gezeigt, daß im Rattenherzen Stickstoffmonoxid (NO) β -adrenozeptorabhängige positiv inotrope Effekte unterdrückt. Ziel der vorliegenden Arbeit war, Kenntnisse über die Wirkung von NO im Zustand myokardialer Hypertrophie zu gewinnen.

Dazu untersuchten wir die Wirkung des NO-Donators S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamin (SNAP) auf Isoprenalin-induzierte positiv inotrope Effekte bei Muskelstreifen des linken Ventrikels in drei verschiedenen Modellen myokardialer Hypertrophie: a) 12-16 Wochen alte männliche Spontanhypertensive Ratten (SHR) vs. gleichaltrige normotensive Wistar-Kyoto-Ratten (WKY), b) im Alter von 6 Wochen 5/6 nephrektomierte männliche Wistar-Kyoto-Ratten (SNX) 7 Wochen nach Nephrektomie vs. scheinoperierte Ratten (SOP) und c) 8 Wochen alte männliche WKY-Ratten mit subtotaler Aortenstenose (AOB) vs. SOP. Bei allen drei Modellen war das Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht signifikant höher als in den Kontrollgruppen. Isoprenalin (10^{-11} - 10^{-5} M) bewirkte konzentrationsabhängige Zunahmen der Kontraktionskraft auf die elektrisch gereizten Ventrikelstreifen. Die maximale Zunahme der Kontraktionskraft war bei SHR vs. WKY gleich, bei SNX und AOB jedoch reduziert. Bei Ratten der Kontrollgruppen (WKY und SOP) rief der NO-Donator SNAP (10^{-5} M) eine signifikante Rechtsverschiebung der Isoprenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurve hervor, diese Rechtsverschiebung konnte durch Methylenblau (10^{-5} M) aufgehoben werden. Bei Ventrikelstreifen von SHR, SNX und AOB hatte SNAP hingegen keinen signifikanten Effekt auf die Isoprenalin-induzierten positiv inotropen Wirkungen. Das lösliche cGMP-Analogon 8-Bromoguanin 3':5'-zyklisches Monophosphat (8-Br-cGMP) hatte den gleichen Effekt wie SNAP. Wir schließen daraus, daß im Zustand myokardialer Hypertrophie NO-Wirkungen beeinträchtigt sind. Solch eine Beeinträchtigung des NO-Systems könnte zur Entwicklung und/oder Erhaltung myokardialer Hypertrophie beitragen.

Weißelberg, Tilman Wilhelm: Die Wirkung von Stickstoffmonoxid auf Isoprenalin-induzierte positiv inotrope Effekte beim hypertrophierten Herzen der Ratte. Halle, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Medizinische Fakultät Dissertation, 35 Seiten, 2001

Thesen

1. Eine Hypertrophie des linken Herzens der Ratte wie bei SHR tritt ebenso nach subtotaler Aortenstenose (AOB) und 5/6-Nephrektomie (SNX) auf.
2. Die Linksherzhypertrophie entwickelt sich bei SNX-Ratten ohne signifikanten Blutdruckanstieg im Vergleich zu WKY, bei SHR ist der Blutdruck am höchsten, gefolgt von AOB.
3. Der Stickstoffmonoxid-Donator SNAP hat einen konzentrationsabhängigen negativ inotropen Einfluß auf Ventrikelstreifen des nicht-hypertrophierten Rattenherzens.
4. Der lösliche Guanylylzyklase-Inhibitor Methylenblau hemmt die negativ inotrope Wirkung des NO-Donators SNAP.
5. NO scheint daher beim Rattenherzen über die Aktivierung löslicher Guanylylzyklase mit Erhöhung des intrazellulären cGMP-Spiegels und dadurch induzierter Erniedrigung des cAMP-Spiegels zu wirken, da auch das cGMP-Analogon 8-Br-cGMP die Konzentrations-Wirkungskurve für Isoprenalin nach rechts verschiebt.
6. Die Wirksamkeit von Isoprenalin auf die maximale Zunahme der Kontraktionskraft von isolierten Ventrikelstreifen ist bei AOB- und SNX-Ratten herabgesetzt, jedoch nicht bei SHR.
7. Der NO-Donator SNAP wie auch das cGMP-Analogon 8-Br-cGMP haben auf den positiv inotropen Effekt von Isoprenalin beim Ventrikelstreifen des hypertrophierten Rattenherzens keinen Einfluß.
8. Der fehlende Einfluß von SNAP und 8-Br-cGMP bei hypertrophierten Herzen scheint in einer Veränderung des Guanylylzyklase/cGMP/Proteinkinase-G-Signalübertragungsweges begründet zu sein.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Ziel dieser Arbeit	1
1.2	Bildung von NO	2
1.3	Wirkung von NO auf das Myokard	3
1.4	Myokardiale Hypertrophie	5
2	Versuchstiere und Methoden	7
2.1	Spontanhypertensive Ratten (SHR) und normotensive Wistar-Kyoto-Ratten (WKY)	7
2.2	Stenoserratten (AOB)	7
2.3	Urämische Ratten (SNX)	7
2.4	Blutdruckmessung	8
2.5	Präparation der Ventrikelstreifen	9
2.6	Versuchsablauf	10
2.7	Verwendete Substanzen	11
2.8	Statistische Auswertung	12
3	Ergebnisse	13
3.1	Myokardiale Hypertrophie und Blutdruck	13
3.2	Bestimmung der β -Adrenozeptor-Subtypen, die an der positiv inotropen Wirkung von Isoprenalin beteiligt sind	14
3.3	Positiv inotrope Wirkung von Isoprenalin bei SHR, SNX- und AOB-Ratten	15
3.4	Einfluß von SNAP und 8-Bromo-cGMP auf den positiv inotropen Effekt von Isoprenalin bei Ratten der Kontrollgruppe	15
3.5	Einfluß von SNAP und 8-Bromo-cGMP auf den positiv inotropen Effekt von Isoprenalin bei SHR, SNX- und AOB-Ratten	18
4	Diskussion	20
5	Zusammenfassung	23

6	Literatur	24
7	Abbildungen	30

1 Einleitung

1.1 Ziel dieser Arbeit

Die Entdeckung von Stickstoffmonoxid (NO) als Zellsignalvermittler ist nach Butler et al. (1995) einer der wichtigsten Fortschritte in der Zellphysiologie in den letzten Jahrzehnten. Furchgott und Zawadzki (1980) erkannten als erste, daß endogene Vasodilatoren wie Azetylcholin nicht direkt auf glatte Muskelzellen wirken, sondern auf Endothelzellen. Diese sollten eine Substanz freisetzen, die zunächst „Endothelium derived relaxing factor“ (EDRF) genannt wurde. Furchgott (1988) vermutete bereits, daß EDRF mit NO identisch sei, von dem bereits bekannt war, daß es die Guanylylzyklase aktiviert und von Butler et al. (1995) ein Schlüsselenzym in der Relaxation glatter Muskelzellen genannt wird. In Versuchen am Rattenherzen konnte gezeigt werden (Furchgott und Zawadzki, 1980; Brady et al., 1993; Sun et al., 1997), daß NO ebenso die positiv inotrope Wirkung β -adrenerger Substanzen beeinflusst. Smith et al. (1996) zeigten eine Abnahme der positiv inotropen Wirkung von Isoprenalin auf Kardiomyozyten nach Kontakt mit Endothelzellen, deren NO-Synthese durch Lipopolysaccharide aktiviert war.

Im Zustand myokardialer Hypertrophie sind die Wirkungen verschiedener Transmitter, Hormone und Pharmaka verändert. Bei hypertrophierten Rattenherzen zeigte sich ein herabgesetzter positiv inotroper Effekt von β -Adrenozeptoragonisten wie Isoprenalin, Dobutamin und Terbutalin (Mertens et al., 1992). Auch für α -adrenerge Substanzen wie Methoxamin und Zirazolin wird ein Verlust an positiv inotroper Wirkung bei Linksherzhypertrophie beschrieben (Foster et al., 1991; Mertens et al., 1993). Diese Autoren induzierten die Hypertrophie durch Aortic banding bzw. untersuchten Herzen von spontanhypertensiven Ratten. Auch bei einer Hypertrophie infolge einer renovaskulären Hypertonie beschrieben Ayobe und Tarazi (1983) einen Wirkverlust von Isoprenalin, Fouad et al. (1985) konnten ebenfalls einen herabgesetzten Effekt von Phenylephrin nachweisen. Arai et al. (1995) dokumentierten für hypertrophierte Rattenherzen eine

erhöhte Anzahl von Endothelinrezeptoren.

Relativ wenig ist über die Wirkungsänderungen von NO auf die Kontraktibilität des hypertrophierten linken Ventrikels bekannt. Um dieser Frage nachzugehen, untersuchten wir den Effekt von NO auf die positiv inotrope Wirkung des β -Adrenozeptoragonisten Isoprenalin auf linksventrikuläre Muskelstreifen aus drei verschiedenen Tiermodellen mit linksventrikulärer Hypertrophie. Als exogenen NO-Donator verwendeten wir S-Nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin (SNAP). Die Modelle waren männliche spontanhypertensive Ratten (SHR) mit manifester Hypertonie im Vergleich zu altersgleichen normotensiven Wistar-Kyoto-Ratten (WKY); 5/6-nephrektomierte Ratten (SNX) gegenüber scheinoperierten Ratten (SOP) und Ratten mit suprarenaler Aortenstenose (AOB) gegenüber scheinoperierten Ratten (SOP).

Isoprenalin ist ein unselektiver β -Adrenozeptoragonist. Um zu untersuchen, ob am Rattenherzen die Wirkung von Isoprenalin durch β_1 - oder β_2 -Adrenozeptoren vermittelt ist, setzten wir die entsprechenden selektiven Antagonisten CGP 20712 A als β_1 -Adrenozeptorantagonist (Dooley et al., 1986) und ICI 118,551 als β_2 -Adrenozeptorantagonist (Bilski et al., 1983) ein. Weiterhin führten wir Versuche mit dem stabilen cGMP-Analogen 8-Bromo-cGMP durch, um zu untersuchen, ob die Wirkung von NO mit einer Aktivierung der löslichen Guanylylzyklase einhergeht.

Die Operationen und Versuche an den Tieren erfolgten nach Zustimmung der Tierschutzbehörde des Landes Sachsen-Anhalt.

1.2 Bildung von NO

NO kann in verschiedenen Zellen des Organismus gebildet werden, darunter in Endothelzellen, Muskelzellen sowie in neuronalen Zellen. Unter aeroben Verhältnissen und in Gegenwart von NADPH wird L-Arginin in L-Citrullin und NO umgewandelt.

Es gibt bisher drei näher beschriebene Isoformen der Nitric Oxide Synthase (NOS), die die Bildung von NO katalysiert (Förstermann et al. 1994). Die Nitric

Oxide Synthase 1 (NOS1) ist in Neuronen des myokardialen Reizleitungssystems nachweisbar, NOS2 im Endokard, in Makrophagen, Fibroblasten, in glatten Muskelzellen der Gefäßwände und in Kardiomyozyten. NOS3 läßt sich in Endothelzellen und in Kardiomyozyten nachweisen. Im Herzen wirksames NO wird somit aus dem Endokard, dem koronaren Endothel und aus Kardiomyozyten freigesetzt (Smith et al. 1991). Die Bedeutung von NO in neuronalen Zellen ist bisher ungeklärt.

NOS ist als ein Dimer beschrieben. Jedes Monomer besteht aus einer Reduktase-Domäne mit einem Carboxyl-Ende sowie einer Oxigenase-Domäne mit einem Aminosäure-Ende sowie einem Häm-Molekül als prosthetischer Gruppe. Beide Domänen sind durch ein Calmodulin-bindendes Mittelteil verbunden. Die Bindung von Calmodulin an diese mittlere Domäne scheint das Dimer über eine Verbindung zweier Mittelteile untereinander zu aktivieren (Kelly et al., 1996). Ein Anstieg der intrazellulären Kalzium-Konzentration führt zu einer Dissoziation des Calmodulins vom Mittelteil und zum Rückgang der Enzymaktivität. Die NO-Konzentration selbst kann auch als Negativ-feed-back die Verfügbarkeit von Häm, das als prosthetische Gruppe wirkt, herabsetzen und somit die Aktivierung neu gebildeter NOS-Monomere verhindern. Die Bildung von NO kann weiterhin durch NOS-Inhibitoren wie Monomethyl-L-Arginin-Monophosphat (NMMA), Nitro-L-Arginin-Methylester (L-NAME) und Guanylylzyklasehemmer wie Methylenblau gehemmt werden.

NO kann neben der beschriebenen endogenen Synthese über NO-Donatoren von außen zugeführt werden. Als solche NO-Donatoren fungieren Nitrosothiole, wie S-Nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin (SNAP) oder Natriumnitroprussid (SNP).

1.3 Wirkung von NO auf das Myokard

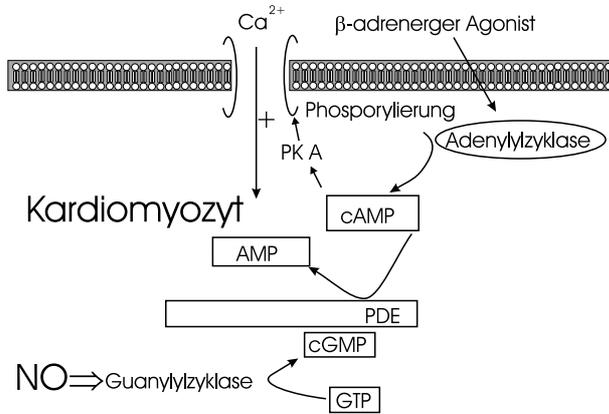
NO kann die Kontraktilität von Muskelzellen herabsetzen (Brady et al., 1993; Manso et al., 2000). Der Mechanismus dieses kontraktilitätssenkenden Effektes von NO ist nicht vollständig bekannt. Er scheint jedoch durch cGMP vermittelt

zu sein (Moncada et al., 1991), da NO die lösliche Guanylylzyklase stimuliert. Diese katalysiert den Umbau von GTP zu cGMP. cGMP ist der hauptsächlichste intrazelluläre second messenger von NO im kardiovaskulären System. Die intrazelluläre cGMP-Konzentration ist ein Gleichgewicht aus seiner Produktion durch Guanylylzyklase, aus seinem Abbau durch intrazelluläre Phosphodiesterasen und aus seinem Export in den Extrazellularraum.

Die Kontraktion von Herzmuskelzellen wird durch die Konzentration von cAMP geregelt (Boutjdir et al., 1992; Dinerman et al., 1993). Die Wahrscheinlichkeit der Öffnung von Kalzium-Kanälen ist abhängig von ihrer Phosphorylierung. Diese geschieht durch die Proteinkinase A, die von cAMP kontrolliert wird. Eine initiale β -adrenerge Stimulation erhöht die Konzentration von cAMP und damit die Wahrscheinlichkeit der Öffnung von Kalzium-Kanälen. Der Abbau von cAMP erfolgt durch Phosphodiesterasen. Deren katalytische Aktivität ist spezifisch für cAMP, wird aber durch cGMP aktiviert. Das scheint der Grund für die negativ inotropen Effekte von NO und cGMP im Herzen zu sein. Eine Erhöhung der cGMP-Konzentration führt zu erhöhtem Abbau von cAMP (Schmidt et al., 1993; Förstermann et al., 1994). Die inhibitorischen Wirkungen von NO auf die Kontraktilität von Herzmuskelzellen können durch den Guanylylzyklasehemmer Methylenblau vermindert werden (Mery et al., 1993).

Brady et al. (1993) konnten zeigen, daß die Kontraktilität von Herzmuskelzellen vom Meerschweinchen durch NO aus dem Endothel, NO aus Nitroprussid-Natrium und NO aus wässriger Perfusionslösung herabgesetzt wird. Nach Smith et al. (1991) scheint dabei die Abnahme der Kontraktionskraft durch eine frühzeitige Relaxation der Muskelzelle zustandezukommen. Eine Veränderung in frühen Phasen der Kontraktion durch NO konnte nicht gefunden werden. Gleiche Ergebnisse konnten mit zellpermeablen cGMP-Analoga wie 8-Bromo-cGMP erzielt werden (Shah et al., 1991), was die Vermutung der cGMP-vermittelten Wirkung von NO stützt (Grocott-Mason et al., 1994). Behandlung von Versuchstieren mit dem cAMP-Phosphodiesterase-Hemmer Milrinon führt zu einer gesteigerten kontraktilen Ansprechbarkeit der Kardiomyozyten auf Isoprenalin. Belhassen et al. (1997) führen dies auf eine Down-Regulation der NOS3 und folglich der NO-Verfügbar-

keit zurück, wobei allerdings auch an eine additive Wirkung von Isoprenalin und Milrinon denkbar wäre.



NO aktiviert über seinen second messenger cGMP die PDE. Diese führt zu erniedrigter Konzentration von cAMP durch Umbau zu AMP. Folge ist die Abnahme der Phosphorylierung von Kalziumkanälen durch die Proteinkinase A. (nach Michel JB, 1996)

1.4 Myokardiale Hypertrophie

Morphologische Studien haben gezeigt, daß eine Massenzunahme des linken Ventrikels bei Herzhypertrophie mit einer Größenzunahme der Muskelzellen verbunden ist. Nach Brilla und Weber (1992) kann diese Hypertrophie bei verschiedenen Modellen von arterieller Hypertonie beobachtet werden, wie infrarenales Aortic banding, suprarenales Aortic banding mit Stenose der rechten A. renalis, Aldosteron-Dauerinfusion sowie salzreiche Diät. Eine Hypertrophie ist ebenso bei Anämie, arteriovenösen Fisteln und Vorhofseptum-Defekt nachweisbar. Andere etablierte Linksherzhypertrophie-Modelle sind spontanhypertensive Ratten sowie 5/6-nephrektomierte Ratten. Untersuchungen von Brilla und Weber (1992) zeigen, daß Folge von erworbener oder genetisch determinierter Hypertonie eine Fibrose mit unproportional erhöhter Konzentration von fibrillärem Kollagen im Myokard des linken Ventrikels ist. Diese Fibrose scheint durch humorale Systeme wie das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System vermittelt zu sein, da sich durch orale Gabe des ACE-Hemmers Captopril die Fibrose verhindern ließ (Jalil et al., 1991). Die bei Hypertrophie zu verzeichnende Gewichtszunahme des linken Ventrikels scheint dabei fast ausschließlich durch Größenzunahme der Muskelzellen verursacht zu sein, denn das Gewicht des myokardialen Kollagens beträgt nach Altman und Dittmer (1971) nur 2% vom Herzfeuchtgewicht. Bei der interstitiellen und perivaskulären Fibrose akkumuliert Kollagen im Interstitium und in

der Adventitia intramyokardialer Koronargefäße. Es handelt sich um eine reaktive Fibrose als Antwort des Gewebes auf die chronische Volumenüberlastung des Ventrikels. Auf zellulärer Ebene kommt es infolge der Fibrose zur Minderversorgung der Muskelzellen mit Nährstoffen und Sauerstoff. Einzelne Muskelzellen nekrotisieren, die nekrotischen Zellen werden nach kurzem lokalem Entzündungsprozeß mit Einwanderung von Fibroblasten durch Narbengewebe ersetzt. Hierbei handelt es sich um eine reparative oder Ersatzfibrose. Reaktive und reparative Fibrose (Anderson et al., 1979) führen beide zur Akkumulierung von Kollagen mit fibrösem Umbau des myokardialen Interstitiums, welcher die Steifigkeit des Herzmuskels auf Kosten der Elastizität erhöht. Dies resultiert in zunächst diastolischer (Rückwärtsversagen) und später systolischer Insuffizienz (Vorwärtsversagen) des Myokards. Bei o. g. Tiermodellen mit Anämie, arteriovenöser Fistel und Vorhofseptum-Defekt wurde hingegen keine Fibrose beobachtet (Michel et al., 1986).

2 Versuchstiere und Methoden

2.1 Spontanhypertensive Ratten (SHR) und normotensive Wistar-Kyoto-Ratten (WKY)

12 - 16 Wochen alte männliche Tiere wurden vom Møllegaard-Zuchtzentrum Schönwalde bezogen und im Zentralinstitut für medizinische Grundlagenforschung der Martin-Luther-Universität weitergezüchtet.

2.2 Stenoserratten (AOB)

Vier Wochen alte männliche WKY-Ratten (mittleres Körpergewicht 80 g) erhielten eine intraperitoneale Injektion von 0,1 ml Narkoselösung (s. Kapitel 2.7). Nach lokaler Rasur und Sprühdesinfektion wurde nach Narkoseeintritt ein Schnitt unterhalb des linken Rippenbogens ausgeführt. Nach Durchtrennen der Muskelschichten erfolgte die Präparation zwischen Leber und Niere durch das Peritoneum zur Aorta abdominalis. Oberhalb des Ursprungs der A. renalis wurde ein Metallstift von 1 mm Durchmesser auf die Aorta abdominalis gebunden, dieser wurde unter dem Faden wieder hervorgezogen. Somit wurde ein verbleibendes Lumen der Aorta von 1 mm Durchmesser gewährleistet. Eine prophylaktische antibiotische Abschirmung der Tiere wurde durch intraperitoneale Instillation von 1 ml Penicillin-Streptomycin-Kombinationspräparat Tardomyocel^R gewährleistet. Die Muskelschichten wurden mit absorbierbarem, die Haut mit nichtresorbierbarem Nahtmaterial vernäht. Die Hälfte der Tiere wurde scheinoperiert (SOP), es wurde hierbei die gleiche Operation ohne Anlage der Stenose durchgeführt. Beide Tiergruppen wurden unter gleichen Bedingungen gehalten, sie hatten freien Zugang zu Wasser und Futter.

2.3 Urämische Ratten (SNX)

6 Wochen alte männliche Wistar-Ratten (mittleres Körpergewicht 200 g) wurden, wie bei Amann et al. (1993) beschrieben, 5/6 nephrektomiert: Die Tiere erhiel-

ten eine intraperitoneale Gabe von 0,2 ml Narkoselösung (s. Kapitel 2.7). Nach Eintritt der Narkose wurde nach lokaler Rasur und Sprühdesinfektion ein Schnitt unterhalb des rechten Rippenbogens ausgeführt und die Niere dargestellt. Nach Unterbindung zu- und abführender Gefäße sowie des Ureters erfolgte die Resektion des Organs und die separate Nahtadaptation von Muskelschicht und Haut mit resorbierbarem bzw. nicht resorbierbarem Material. Eine Woche später wurde die linke Niere subtotal, d. h. 5/6-reseziert, hierbei erfolgte die Resektion von oberem und unterem Nierenpol sowie der Nierenkonvexität, ein intaktes Mittelsegment und der Nierenpol mit Gefäßen und Ureter wurden belassen. Eine Gruppe von Tieren wurde scheinoperiert (SOP), hierbei wurden die gleichen Operationen ohne Resektion bzw. 5/6-Resektion der Niere ausgeführt. Beide Tiergruppen erhielten die gleiche Nahrung (Diät aus 22,5% Protein, 0,2% Natrium, 1% Kalium; Altromin, Lage), eine Woche vor Versuchsbeginn eine kaliumarme Diät. Die SOP-Tiere erhielten nach erfolgter Operation die gleiche Menge an Nahrung, die am Vortag von den SNX-Tieren konsumiert worden war. 7 Wochen nach der zweiten Operation hatten die SNX-Tiere ($n = 6$) Plasma-Kreatininspiegel von $76,3 \pm 6,3 \mu\text{mol/l}$ vs. $43,3 \pm 0,7 \mu\text{mol/l}$ (SOP, $n = 6$, $p < 0,05$), die Plasma-Harnstoffspiegel lagen bei $11,7 \pm 1 \text{ mmol/l}$ (SNX, $n = 6$) vs. $6,55 \pm 0,5 \text{ mmol/l}$ (SOP, $n = 6$, $p < 0,05$). Die nichtinvasive Blutdruckmessung und die Herzentnahme erfolgten wie unten beschrieben.

2.4 Blutdruckmessung

Die Messung des systolischen Blutdruckes erfolgte mit dem Sphygmomanometer S-2, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, nichtinvasiv am Schwanz der wachen, nichtnarkotisierten Ratte. Das Gerät besteht aus dem Meßgerät mit Manschette und Pulssensor und der Meßplattform, auf die der Wärmekäfig aufgesetzt ist. Die Konstanthaltung der Temperatur im Wärmekäfig wird durch zwei elektronisch gesteuerte Heizlüfter gewährleistet, sie beträgt 34°C . Auf einem einkanaligen Oszilloskop kann die Pulsation des Meßsignales, übertragen durch den Pulssensor, beobachtet werden.

Zur Messung wird die Ratte in ein Rohr plaziert und für 30 Minuten in den Wärmekäfig gelegt. Das Rattenrohr wird auf die Haltefüße gelegt, auf den Schwanz der Ratte werden die Blutdruckmanschette und der Pulssensor geschoben. Die Manschette, die über einen Schlauch mit dem Meßgerät verbunden ist, wird bis kurz über den Wert aufgepumpt, bei dem keine Pulsation am Oszilloskop mehr zu beobachten ist. Die Druckabsenkung erfolgt anschließend, bis wieder eine Pulsation erscheint. Der Druck an dieser Stelle wird als systolischer Blutdruck notiert. Eine Messung des diastolischen Druckes ist mit diesem Gerät nicht möglich.

Die Messung erfolgt je 5 mal an drei aufeinanderfolgenden Tagen und wird dann gemittelt. Zur Erzielung von repräsentativen Werten ist Ruhe zu halten, die Messung sollte immer durch die gleiche Person erfolgen.

Bei AOB-Ratten wurde der Blutdruck invasiv gemessen. Hierzu wurde nach Präparation der Gefäße am Hals und in der Leistengegend eine Kanüle in die A. carotis und femoralis eingeführt, diese war mit dem Meßgerät über ein hydraulisches System verbunden. Der systolische und diastolische Blutdruck wurde als Amplitudenausschlag dargestellt (Graphtec Linearcorder WR 3310, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten).

2.5 Präparation der Ventrikelstreifen

8 Wochen postoperativ wurden AOB-Ratten, SNX-Ratten und beide Schein-Op-Gruppen, im Alter von 12-16 Wochen die SHR und WKY-Ratten mit einer intraperitonealen Injektion von 50 mg/kg KG Pentobarbital narkotisiert. Die narkotisierten Tiere wurden durch Dislokation der Halswirbelsäule getötet. Nach bilateraler Thorakotomie wurde das schlagende Herz nach Trennung von den Blutgefäßen entnommen und in Krebs-Henseleit-Lösung gelegt.

Nach Messung des Herzgewichtes erfolgte die Fixierung des Herzens mit Nadeln auf Wachs in einer mit Krebs-Henseleit-Lösung gefüllten und mit Carbogen begasten Glasschale. Die Vorhöfe wurden entfernt und der linke Ventrikel durch Schneiden von der Aorta in Richtung Herzspitze durch die Herzvorderwand eröff-

net. Nach Entfernung der Papillarmuskeln wurden aus dem nun offen liegenden linken Ventrikel entlang der Gewebetextur Muskelstreifen geschnitten, für ein Experiment je vier Muskelstreifen aus einem Herzen. Für jeden Muskelstreifen wurde wie unten beschrieben eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve erarbeitet. Für ein Herz ($n=1$) ergaben sich somit je vier Konzentrations-Wirkungs-Kurven, deren Werte in die Zusammenstellung der Kurve eingingen. Die Streifen hatten eine Länge von 6 - 8 mm, eine Breite von 1,5 - 2 mm und eine Dicke von 1 - 1,5 mm.

2.6 Versuchsaufbau

Das Registrierteil (Servomed, Fa. Hellige, Freiburg im Breisgau) wurde nach dem Einschalten zunächst bei einer Verstärkung von 2, 5 und 10 mV auf Null geeicht. Ein Eichgewicht von 100 mg wurde eingehängt, der Zeigerausschlag bei 2 mV Verstärkung auf 60 mm eingestellt und das Eichgewicht nach Abtragung der Ausschläge bei 5 und 10 mV wieder entfernt. Die Muskelstreifen wurden an ihren beiden Enden mit Schlaufen aus Zwirnsfaden zwischen die Elektroden des Organbades (gefertigt durch die Glasbläserei der Martin-Luther-Universität) gehängt. Das Organbad war mit 10 ml Krebs-Henseleit-Lösung gefüllt und ständig mit Carbogen begast. Der pH-Wert der Lösung betrug 7,4. Mittels einer Umwälzpumpe (Colora Meßtechnik GmbH, Lorch) wurde das Organbad auf 37°C beheizt. Nach Vorspannung der Muskelstreifen bei einer Verstärkung von 2 mV bis zu einem Zeigerausschlag von 60 mm nach o. g. Eichung erfolgte eine Reizung mit 1,5-facher Reizschwellenstromstärke (Stimulator II, Fa. Hugo Sachs, March-Hugstetten) über zwei Platinelektroden, zwischen die der Streifen gehängt war, ohne sie zu berühren. Der Stimulator liefert Rechteckimpulse von 5 ms Dauer mit einer Frequenz von 1 Hz. Die Kontraktionen wurden mit dem Registrierteil als Amplitudenausschlag aufgezeichnet. Diese wurden in mm abgemessen, dann entsprechend der Eichkurve in mN umgerechnet (der Zeigerausschlag bei 100 mg entspricht einer Kraft von 0,981 mN) und in das Computerprogramm GraphPad Prism 2.0 eingegeben, welches nach Umrechnung der Absolut- in Prozentualwerte die Kurven erstellte.

Eine Stunde vor Beginn des Experiments äquilibrierten die Muskelstreifen in der Krebs-Henseleit-Lösung, diese wurde alle 15 Minuten gewechselt. Es wurden dann kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Isoprenalin aufgenommen. Dazu wurde ausgehend von 10^{-11} M die Konzentration um je 0,5 logarithmische Einheiten erhöht (Van Rossum et al., 1963). Nach Erreichen eines Plateaus wurde die jeweils höhere Dosis ohne nochmalige Spülung appliziert. Beendet wurde die Konzentrationsreihe bei 10^{-5} M bzw. bei Auftreten einer Arrhythmie, bei den Versuchen mit CGP 20712 A (CGP) und ICI 118,551 (ICI) bei 10^{-3} M.

Für die Experimente mit SNAP, CGP und ICI wurde zunächst eine Isoprenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurve für die Muskelstreifen des Versuchstages aufgenommen. Anschließend wurden nach dreimaligem Spülen mit Krebs-Henseleit-Lösung die Muskelstreifen eine Stunde mit 10^{-5} M SNAP, 3×10^{-7} M CGP bzw. 5×10^{-8} M ICI inkubiert. Es folgte ohne nochmaliges Spülen die erneute Aufnahme einer Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Isoprenalin. Für die Versuche mit Methylenblau wurde zunächst eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Isoprenalin, dann wie oben beschrieben von Isoprenalin mit SNAP aufgenommen. Nach dreimaligem Spülen wurden die Muskelstreifen mit 10^{-5} M Methylenblau und 10^{-5} M SNAP inkubiert, es wurde erneut eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Isoprenalin aufgenommen.

Für die Versuche mit 8-Bromo-cGMP wurde zunächst eine Konzentrations-Wirkungskurve von Isoprenalin aufgenommen, nach dreimaligem Spülen wurde die Muskelstreifen für eine Stunde mit 10^{-5} bzw. 10^{-4} M 8-Bromo-cGMP inkubiert, anschließend wurde erneut die Konzentrations-Wirkungskurve für Isoprenalin aufgenommen.

2.7 Verwendete Substanzen

- Narkoselösung, selbst hergestellt aus Ketaminhydrochlorid 200 mg; Xylazinhydrochlorid 10 mg; 0,9%-ige NaCl-Lösung 2,5 ml: Sigma Chemical Co., St. Louis; Atropinsulfat 0,125 ml (Konzentration 1 mg/ml): Eifelfango, Bad Neuenahr

- Tardomyocel^R: Bayer AG, Leverkusen
- Pentobarbital: United Pharmaceutical Works, Praha
- Krebs-Henseleit-Lösung, selbst hergestellt (NaCl 136,9 mM; KCl 5,4 mM; MgCl 1,05 mM; NaHCO₃ 25 mM; CaCl₂ 2,52 mM; Glukose 9,7 mM, Ascorbinsäure 0,11 mM, EDTA 0,0228 mM): sämtlich Merck, Darmstadt
- Carbogen (95% Sauerstoff, 5% Kohlendioxid): AGA Gas GmbH, Hamburg
- Isoprenalin-Stammlösung: 3,613 mg (-)-Isoproterenol(+)-Bitartrat-Salz werden mit 10 ml H₂O versetzt und als Konservierungsmittel 5,85 l 1 n HCl zugegeben. Ausgehend von dieser täglich neu hergestellten 10⁻³ M Stammlösung wurde eine Verdünnungsreihe bis 10⁻¹¹ M hergestellt. Sigma Chemical Co., St. Louis
- SNAP, CGP 20712 A (1-[2-((3-carbamoyl-4-hydroxy)phenoxy)ethylamino]-3-[4-(1-methyl-4-trifluoromethyl-2-imidazolyl)phenoxy]-2-propanol methanesulfonate), ICI 118,551 (erythro-dl-1-(7-methylindan-4-yloxy)-3-isopropylaminobutan-2-ol): Alexis Biochemicals, Grünberg
- Methylenblau: LC Laboratories, Woburn
- 8-Bromoguanin 3':5'-zyklisches Monophosphat: Sigma Chemical Co., St. Louis

2.8 Statistische Auswertung

Die Daten der Experimente im Text und in den Abbildungen sind Mittelwerte \pm SEM (mittlerer Fehler des Mittelwertes) von n Versuchen. Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurden an eine sigmoidale Funktion angepaßt, die pD₂-Werte wurden durch Nichtlineare Regressionsanalyse mit Hilfe des Programms GraphPad Prism 2.0 (GraphPad Software, San Diego) berechnet. Die Signifikanz von Differenzen zwischen Meßwerten wurde durch den ungepaarten t-Test ermittelt. Einen p-Wert < 0,05 betrachteten wir als signifikant.

3 Ergebnisse

3.1 Myokardiale Hypertrophie und Blutdruck

Alle drei Tiermodelle zeigten einen ähnlichen Grad von linksventrikulärer Hypertrophie, ausgedrückt als das Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht (s. Tab. 1). Auf der anderen Seite war die Hypertonie bei den drei untersuchten Tiermodellen unterschiedlich ausgeprägt. So war der systolische Blutdruck der A. carotis bei den AOB-Ratten (177 ± 9 mm Hg) signifikant höher als bei den SOP-Ratten (126 ± 5 mm Hg, $p < 0,01$). Dementsprechend betrug der Unterschied im Blutdruck zwischen der A. carotis und der A. femoralis bei den AOB-Ratten 63 ± 6 mm Hg, bei den SOP-Ratten 1 ± 3 mm Hg. Bei den WKY-Ratten betrug der systolische Blutdruck $104 \pm 2,2$ mm Hg, während er bei den SHR-Ratten mit 189 ± 3 mm Hg erwartungsgemäß hoch war, bei den SNX-Ratten hingegen ergab sich kein signifikanter Unterschied im Blutdruck zu den SOP-Ratten (s. Tab. 1).

	WKY n=7	SHR n=7	SNX n=6	SOP(SNX) n=6	AOB n=9	SOP(AOB) n=6
KG (g)	307±2	270±9	299±3,2	302±4	286±5,4	298±3
HG (mg)	980±30	1120±40**	1220±40**	950±10	1320±40**	1010±10
HG/KG (mg/g)	3,19±0,08	4,15±0,11**	4,10±0,24**	3,15±0,14	4,62±0,29**	3,39±0,04
P Schw. (mmHg)	104±2	189±3**	124±12	119±6		
P A.c. (mmHg)					177±9**	126±5
P A.f. (mmHg)					114±5	125±4

Tabelle 1: KG=Körpergewicht, HG=Herzgewicht, HG/KG=Verhältnis Herzgewicht/Körpergewicht, P=systolischer Blutdruck, Schw.=Schwanz, A.c.=Arteria carotis, prä-Stenose, A.f.=Arteria femoralis, post-Stenose. Mittelwerte \pm mittlerer Fehler des Mittelwertes, n = Anzahl der Versuche, **) $p < 0,01$ verglichen mit den entsprechenden Kontrollen

3.2 Bestimmung der β -Adrenozeptor-Subtypen, die an der positiv inotropen Wirkung von Isoprenalin beteiligt sind

An isolierten elektrisch gereizten linksventrikulären Streifen des Rattenherzens führte Isoprenalin (10^{-11} - 10^{-5} M) zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme der Kontraktionskraft (Abb. 1), der maximale Effekt von Isoprenalin wurde bei einer Konzentration von 10^{-6} M erreicht, der pD_2 -Wert für Isoprenalin betrug in den einzelnen Modellen 7,8 - 8,2 (s. Tab. 2). Da mehrere Arbeiten gezeigt hatten,

	WKY n=7	SHR n=7	SNX n=6	SOP(SNX) n=6	AOB n=9	SOP(AOB) n=6
bKK (mN)	5,4±0,46	4,2±0,59	3,9±0,37	3,9±0,37	6,5±0,76	5,2±0,81
mZKK (mN)	3,7±0,34	3,9±0,22	2,9±0,29*	5,1±0,34	2,3±0,37*	4,2±0,33
pD_2	7,71±0,07	7,88±0,12	7,9±0,12	8,2±0,09	8,2±0,09	7,73±0,09

Tabelle 2: Die basale Kontraktionskraft (bKK) sowie die maximale Zunahme der Kontraktionskraft (mZKK) der verschiedenen Rattenmodelle unter Isoprenalin in mN. In der letzten Zeile sind die zugehörigen pD_2 -Werte für Isoprenalin angegeben. n = Anzahl der Versuche, *) $p < 0,05$ verglichen mit den entsprechenden Kontrollen

daß im Rattenherzen sowohl β_1 - als auch β_2 -Adrenozeptoren existieren (Cros et al., 1988; Mertens et al., 1992 a; Xiao und Lakatta, 1993; Übersicht siehe Stiles et al., 1984 und Brodde, 1987), untersuchten wir zunächst, ob der positiv inotrope Effekt von Isoprenalin über β_1 - oder β_2 -Adrenozeptoren (oder über beide β -Adrenozeptor-Subtypen) vermittelt wird. Dazu bestimmten wir Konzentrations-Wirkungs-Kurven für Isoprenalin in Gegenwart des β_1 -Adrenozeptor-Antagonisten CGP 20712 A und des β_2 -Adrenozeptor-Antagonisten ICI 118,551. Wie Abb. 1 zeigt, wurde in Gegenwart von 3×10^{-7} M CGP 20712 A die Konzentrations-Wirkungs-Kurve für Isoprenalin um mehr als drei Zehnerpotenzen nach rechts in den Bereich höherer Konzentrationen verschoben; zusätzliche Gabe des β_2 -Adrenozeptor-Antagonisten ICI 118,551 (5×10^{-8} M) hatte auf diese Rechtsver-

schiebung nahezu keinen Einfluß. Diese Befunde lassen den Schluß zu, daß die Wirkung von Isoprenalin am Rattenherzen überwiegend, wenn nicht ausschließlich über β_1 -Adrenozeptoren vermittelt wird.

3.3 Positiv inotrope Wirkung von Isoprenalin bei SHR, SNX- und AOB-Ratten

Als nächstes untersuchten wir die Wirkungen von Isoprenalin auf linksventrikuläre Streifenpräparate von SHR-, SNX- und AOB-Ratten (Abb. 2). Während die maximale Zunahme der Kontraktionskraft durch Isoprenalin bei SHR-Ratten von der bei altersgleichen WKY-Ratten nicht signifikant verschieden war, führte Isoprenalin an linksventrikulären Streifen von Herzen von AOB- und SNX-Ratten zu einer signifikant geringeren maximalen Kontraktionskraft-Zunahme als in den entsprechenden SOP-Ratten (Tab. 2, $p < 0,01$). Die pD_2 -Werte von Isoprenalin hingegen waren in operierten und SOP-Ratten nahezu identisch (Tab. 2).

3.4 Einfluß von SNAP und 8-Bromo-cGMP auf den positiv inotropen Effekt von Isoprenalin bei Ratten der Kontrollgruppe

Nachfolgend untersuchten wir den Einfluß des NO-Donators SNAP (10^{-5} M und 10^{-4} M) auf die Wirkungen von Isoprenalin. In den linksventrikulären Streifen von WKY-, SOP(SNX)- und SOP(AOB)-Ratten führte der NO-Donator SNAP zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der basalen Kontraktionskraft (s. Tab. 3) wie auch zu einer signifikanten Rechtsverschiebung der Konzentrationswirkungen für Isoprenalin (Abb. 3, Tab. 4). Der hemmende Effekt von SNAP (10^{-5} M) auf die basale Kontraktionskraft wie auch auf den positiv inotropen Effekt von Isoprenalin konnte durch den Guanylylzyklase-Inhibitor Methylenblau antagonisiert werden (Abb. 3). Darüber hinaus war das zellpermeable Analogon von cGMP, 8-Bromo-cGMP (10^{-5} M und 10^{-4} M), ebenfalls in der Lage, die Konzentrations-Wirkungs-Kurve für die Isoprenalin-vermittelte positiv inotrope

Wirkung nach rechts in den Bereich höherer Konzentrationen in einer konzentrationsabhängigen Weise zu verschieben (Tab. 5 und 6, Abb. 4).

	WKY n=7	SOP(SNX) n=6	SOP(AOB) n=6
Kontrolle	5,4±0,46	3,9±0,37	5,2±0,81
+SNAP(10 ⁻⁵ M)	3,3±0,32**	2,5±0,3*	3,1±0,57*
+SNAP(10 ⁻⁴ M)	2,6±0,25**	-	-
+SNAP(10 ⁻⁵ M)	3,9±0,62	-	-
+Meth.blau(10 ⁻⁵ M)			

Tabelle 3: Einfluß von SNAP auf die basale Kontraktionskraft (in mN) von Ventrikelstreifen der WKY-, SOP(SNX)- und SOP(AOB)-Ratte. Mittelwerte ± mittlerer Fehler des Mittelwertes, n = Anzahl der Versuche, **)p < 0,01, *)p < 0,05 verglichen mit den entsprechenden Kontrollen

	WKY n=7	SOP(SNX) n=6	SOP(AOB) n=6
Kontrolle	7,71±0,07	8,2±0,09	7,83±0,09
+SNAP(10 ⁻⁵ M)	7,24±0,09**	7,4±0,34*	7,2±0,12*
+SNAP(10 ⁻⁴ M)	6,74±0,1**	-	-
+SNAP(10 ⁻⁵ M)	7,85±0,05	-	-
+Meth.blau(10 ⁻⁵ M)			

Tabelle 4: Einfluß von SNAP auf die pD₂ -Werte von Isoprenalin für die Zunahme der Kontraktionskraft von Ventrikelstreifen der WKY-, SOP(SNX)- und SOP(AOB)-Ratte. Mittelwerte ± mittlerer Fehler des Mittelwertes, n = Anzahl der Versuche, **)p < 0,01, *)p < 0,05 verglichen mit den entsprechenden Kontrollen

	WKY n=7	SOP(SNX) n=6	SOP(AOB) n=6
Kontrolle	5,3±0,46	3,9±0,39	5,1±0,8
+8-Br-cGMP(10 ⁻⁵ M)	3,5±0,3**	2,3±0,33*	3,3±0,5*
+8-Br-cGMP(10 ⁻⁴ M)	2,4±0,35**	-	2,5±0,3*

Tabelle 5: Einfluß von 8-Br-cGMP auf die basale Kontraktionskraft (in mN) von Ventrikelstreifen der WKY-, SOP(SNX)- und SOP(AOB)-Ratte. Mittelwerte ± mittlerer Fehler des Mittelwertes, n = Anzahl der Versuche, **)p < 0,01, *)p < 0,05 verglichen mit den entsprechenden Kontrollen

	WKY n=7	SOP(SNX) n=6	SOP(AOB) n=6
Kontrolle	7,71±0,07	8,2±0,09	7,83±0,09
+8-Br-cGMP(10 ⁻⁵ M)	7,2±0,08**	7,3±0,35*	7,3±0,15*
+8-Br-cGMP(10 ⁻⁴ M)	6,81±0,1**	-	6,86±0,05*

Tabelle 6: Einfluß von 8-Br-cGMP auf die pD₂ -Werte von Isoprenalin für die Zunahme der Kontraktionskraft von Ventrikelstreifen der WKY-, SOP(SNX)- und SOP(AOB)-Ratte. Mittelwerte ± mittlerer Fehler des Mittelwertes, n = Anzahl der Versuche, **)p < 0,01, *)p < 0,05 verglichen mit den entsprechenden Kontrollen

3.5 Einfluß von SNAP und 8-Bromo-cGMP auf den positiv inotropen Effekt von Isoprenalin bei SHR, SNX- und AOB-Ratten

Schließlich untersuchten wir den Einfluß des NO-Donators SNAP sowie von 8-Bromo-cGMP auf linksventrikuläre Streifen von hypertrophierten Herzen von SHR-, AOB- und SNX-Ratten. In diesen drei hypertrophierten Geweben hatte SNAP (10^{-5} M) im Gegensatz zu den drei Herzen der Kontrollgruppe (s. Abb. 3) keinen signifikanten Einfluß auf die Konzentrations-Wirkungskurve des positiv inotropen Effektes von Isoprenalin (Tab. 7 und 8, Abb. 5). Darüber hinaus war auch der Einfluß von SNAP auf die basale Kontraktionskraft in diesen hypertrophierten Ventrikelstreifen signifikant geringer als in den Ratten der Kontrollgruppen. Schließlich hatte auch 8-Bromo-cGMP (10^{-5} M) (Tab. 9 und 10, Abb. 6) keinen signifikanten Einfluß auf die durch Isoprenalin hervorgerufenen positiv inotropen Effekte.

	SHR n=7	SNX n=6	AOB n=9
Kontrolle	4,2±0,59	3,9±0,37	6,5±0,76
+SNAP(10^{-5} M)	3,1±0,70	2,9±0,31	5,3±0,38

Tabelle 7: Einfluß von SNAP auf die basale Kontraktionskraft (in mN) von Ventrikelstreifen der SHR-, SNX- und AOB-Ratte. Mittelwerte \pm mittlerer Fehler des Mittelwertes, n = Anzahl der Versuche

	SHR n=7	SNX n=6	AOB n=9
Kontrolle	7,88±0,12	7,9±0,12	8,2±0,09
+SNAP(10 ⁻⁵ M)	7,64±0,09	7,6±0,09	8,0±0,12

Tabelle 8: Einfluß von SNAP auf pD₂ -Werte von Isoprenalin für die Zunahme der Kontraktionskraft von Ventrikelstreifen der SHR-, SNX- und AOB-Ratte. Mittelwerte ± mittlerer Fehler des Mittelwertes, n = Anzahl der Versuche

	SHR n=7	SNX n=6	AOB n=9
Kontrolle	4,1±0,6	3,8±0,35	6,3±0,81
+8-Br-cGMP(10 ⁻⁵ M)	3,0±0,65	2,7±0,33	5,4±0,4
+8-Br-cGMP(10 ⁻⁴ M)	3.1±0.6	-	2.9±0,32

Tabelle 9: Einfluß von 8-Br-cGMP auf die basale Kontraktionskraft (in mN) von Ventrikelstreifen der SHR-, SNX- und AOB-Ratte. Mittelwerte ± mittlerer Fehler des Mittelwertes, n = Anzahl der Versuche

	SHR n=7	SNX n=6	AOB n=9
Kontrolle	7,8±0,03	7,85±0,04	8,23±0,05
+8-Br-cGMP(10 ⁻⁵ M)	7,8±0,02	7,8±0,03	8,16±0,015
+8-Br-cGMP(10 ⁻⁴ M)	7,6±0,02	-	8,24±0,05

Tabelle 10: Einfluß von 8-Br-cGMP auf pD₂ -Werte von Isoprenalin für die Zunahme der Kontraktionskraft von Ventrikelstreifen der SHR-, SNX- und AOB-Ratte. Mittelwerte ± mittlerer Fehler des Mittelwertes, n = Anzahl der Versuche

4 Diskussion

In unserer Arbeit benutzten wir drei Modelle von Linksherzhypertrophie, um den Einfluß von NO, zugefügt durch den NO-Donator SNAP, auf die durch Isoprenalin hervorgerufene Zunahme der Kontraktionskraft zu untersuchen. Es ist nunmehr allgemein anerkannt, daß eine langzeitige Erhöhung des systolischen Blutdrucks in der SHR-Ratte zur linksventrikulären Hypertrophie führt (Sen et al., 1974). In ähnlicher Weise gilt das Modell des suprarenalen Aortic Banding als ein Überlast-Modell zur linksventrikulären Hypertrophie (Übersicht siehe Smith und Nuttall, 1985). Auf der anderen Seite ist die myokardiale Hypertrophie auch ein sehr bekanntes Begleitphänomen der chronischen Urämie beim Menschen (Silberberg et al., 1989) und experimentellen Tiermodellen (Rambausek et al., 1985). Interessanterweise tritt bei einer chronischen Urämie eine solche Hypertrophie auch dann auf, wenn der Blutdruck durch antihypertensive Therapie normalisiert wurde. In der vorliegenden Arbeit ist die Ursache der myokardialen Hypertrophie bei den SHR- und AOB-Ratten sehr wahrscheinlich in dem hohen Blutdruck zu suchen, während bei den SNX-Ratten eine myokardiale Hypertrophie sich entwickelte, obwohl der Blutdruck normal war.

In der vorliegenden Arbeit führte der NO-Donator SNAP bei isolierten elektrisch gereizten linksventrikulären Streifen von Herzen der Kontrollgruppen zu einer signifikanten Abnahme der basalen Kontraktionskraft und zu einer signifikanten Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve für den positiv inotropen Effekt von Isoprenalin. Diese Ergebnisse sind in guter Übereinstimmung mit kürzlich publizierten Studien an anderen Spezies (Brady et al., 1993), menschliche Vorhöfe und Papillarmuskeln eingeschlossen (Flesch et al., 1997), daß NO eine signifikante Abnahme der basalen als auch der durch Isoprenalin stimulierten Kontraktionskraft hervorruft. Diese NO-Effekte können durch das stabile cGMP-Analogon 8-Bromo-cGMP nachgeahmt (Brady et al., 1993; Flesch et al., 1997; vorliegende Arbeit Abb. 4) und gehemmt werden durch den Inhibitor der löslichen Guanylylzyklase, Methylenblau (Brady et al., 1993; Flesch et al., 1997; vorliegende Arbeit Abb. 3). Dies läßt den Schluß zu, daß die Effekte von NO

via Aktivierung der löslichen Guanylylzyklase mit nachfolgender Zunahme des intrazellulären Gehaltes an cGMP einhergehen. Es ist seit langer Zeit bekannt, daß NO-Donatoren (z. B. Natrium-Nitroprussid) den intrazellulären Gehalt an cGMP erhöhen können (Inui et al., 1982; Flesch et al., 1997). Eine Arbeit an adulten linksventrikulären Kardiomyozyten der Ratte von Ito et al. (1997) hat gezeigt, daß ein Mechanismus von NO via cGMP oder von 8-Bromo-cGMP eine intrazelluläre Azidifizierung sein könnte, die zu einer Abnahme der Empfindlichkeit der Myofilamente gegen Kalzium führt (Spitzer und Bridge, 1992), was den negativ inotropen Effekt neben dem NO-getriggerten Abbau von cAMP erklären könnte.

Der Hauptbefund der vorliegenden Arbeit ist, daß in hypertrophierten linken Ventrikeln (unabhängig von ihrer Genese, siehe oben) der negativ inotrope Effekt des NO-Donators SNAP wie auch von 8-Bromo-cGMP nicht mehr nachweisbar war. So war die durch NO hervorgerufene Abnahme der basalen Kontraktionskraft signifikant reduziert, darüber hinaus hatte NO keinen signifikanten Einfluß auf die Konzentrations-Wirkungskurve für durch Isoprenalin hervorgerufene positiv inotrope Effekte, ähnliches galt auch für das zellpermeable cGMP-Analogon 8-Bromo-cGMP. Es ist wichtig darauf hinzuweisen, daß dieser fehlende Effekt von NO nicht darauf zurückzuführen ist, daß der Blutdruck der Tiere erhöht war, da wir diese Befunde in allen drei Modellen der linksventrikulären Hypertrophie beobachteten, obwohl nur bei SHR- und AOB-Ratten, nicht aber bei SNX-Ratten der Blutdruck erhöht war. Der fehlende Effekt von NO ist auch nicht darauf zurückzuführen, daß in den hypertrophierten Ventrikeln der Isoprenalinearbeit erniedrigt ist, da (in Übereinstimmung mit der Literatur) die maximal durch Isoprenalin hervorgerufene Kontraktionskraft zwar bei AOB- (Mertens et al., 1992b) und SNX-Ratten (Mann et al., 1986) erniedrigt war, aber nicht bei SHR-Ratten (Mertens et al., 1992a). Ähnliche Befunde wurden kürzlich von Ito et al. (1997) beschrieben. Diese Autoren konnten zeigen, daß in adulten linksventrikulären Kardiomyozyten der NO-Donator Natrium-Nitroprussid die Kontraktilität in normalen Kardiomyozyten erniedrigen konnte, aber keinen Einfluß auf Kardiomyozyten hatte, die von AOB-Ratten erhalten worden waren. Wie oben diskutiert, sind die

Effekte von NO vermutlich vermittelt durch Aktivierung der löslichen Guanylylzyklase. Dementsprechend kann postuliert werden, daß der fehlende Effekt von SNAP auf den positiv inotropen Effekt von Isoprenalin in hypertrophierten linksventrikulären Streifen auf einen Effekt im Guanylylzyklase/cGMP/Proteinkinase-G-System zurückzuführen ist. Eine Möglichkeit wäre ein verringerter Gehalt an Proteinkinase G, die ja die Effekte von cGMP vermittelt (Lohmann et al., 1991). In der Tat konnten Ecker et al. (1989) zeigen, daß in Herzen von SHR der Gehalt an cGMP-Kinase um ca. 50% reduziert ist, verglichen mit normotensiven Kontrollen. Darüber hinaus bestand eine signifikante inverse Korrelation zwischen der Höhe des Blutdrucks bzw. der daraus resultierenden linksventrikulären Hypertrophie und der linksventrikulären cGMP-Konzentration.

Solch ein Defekt in der cGMP-Signalübertragung könnte wesentliche pathophysiologische Konsequenzen haben. So konnte gezeigt werden, daß der atriale natriuretische Faktor (ANF), der seine Wirkung auch über das Guanylylzyklase/cGMP/Proteinkinase-G-System vermittelt, eine antiproliferative Wirkung in Rattenkardiomyozyten entfaltet (Fujisaki et al., 1995). In hypertrophierten Herzen sollte die antiproliferative Wirkung von ANF via cGMP daher herabgesetzt sein. Das könnte erklären, warum sich eine myokardiale Hypertrophie entwickeln kann, obwohl die ANF-Spiegel bei Patienten mit kardialer Überlast und Hypertrophie signifikant erhöht sind (Anand-Srivastava et al., 1993).

5 Zusammenfassung

Zusammenfassend zeigen die Befunde der vorliegenden Arbeit, daß in drei Rattenmodellen mit linksventrikulärer Hypertrophie ein ähnliches Ausmaß an Hypertrophie mit einer fehlenden Wirkung von NO (via NO-Donator SNAP) auf die durch Isoprenalin hervorgerufene positiv inotrope Wirkung einhergeht. Auch das zellpermeable cGMP-Analogon 8-Bromo-cGMP hatte bei hypertrophierten Ventrikeln keinen Effekt mehr. Diese Befunde lassen den Schluß zu, daß in der kardialen Hypertrophie die Wirkungen von NO abgeschwächt sind. Eine solche Beeinträchtigung der kardialen NO-Effekte bei myokardialer Hypertrophie könnte zur Entwicklung und/oder Aufrechterhaltung der kardialen Hypertrophie beitragen.

6 Literatur

Altman P L, Dittmer D S (Hrsg.): Respiration and Circulation. Federation of American Societies for Experimental Biology. Bethesda, Md., 1971, S. 258.

Amann K, Irzyniec T, Mall G, Ritz E: The effect of enalapril on glomerular growth and glomerular lesions after subtotal nephrectomy in the rat: a stereological analysis. *J Hypertens* 11 (1993) 969-976.

Anand-Srivastava MB, Trachte GJ: Atrial natriuretic factor receptors and signal transduction mechanisms. *Pharmacol Rev* 45 (1993) 455-497

Anderson KR, St John Sutton MG, Lie JT: Histopathological types of cardiac fibrosis in myocardial disease. *J Pathol* 128 (1979) 79-85

Arai M, Yoguchi A, Iso T, Takahashi T, Imai S, Murata K, Suzuki T: Endothelin-1 and its binding sites are upregulated in pressure overload cardiac hypertrophy. *Am J Physiol* 268 (1995) H2084-H2091

Ayobe MH, Tarazi RC: beta-Receptors and contractile reserve in left ventricular hypertrophy. *Hypertension* 5 (1983) I192-197

Belhassen L, Kelly R A, Smith T W, Balligand J-L: Nitric Oxide Synthase (NOS3) and Contractile Responsiveness to Adrenergic and Cholinergic Agonists in the Heart. *J Clin Invest* (1997) 1908-1915

Bilski AJ, Halliday SE, Fitzgerald JD, Wale JL: The pharmacology of a β_2 -selective adrenoceptor antagonist (ICI 118,551). *J Cardiovasc Pharmacol* 5 (1983) 430-437

Boutjdir M, Restivo M, Wei Y, el-Sherif N: Alpha-1 and beta-adrenergic interactions on L-type calcium current in cardiac myocytes. *Pflügers Arch* 421 (1992) 397-399

- Brady AJ, Warren JB, Poole-Wilson PA, Williams TJ, Harding SE: Nitric oxide attenuates cardiac myocyte contraction. *Am J Physiol* 265 (1993) H176-H1822
- Brilla Chr, Weber KT: Reactive myocardial fibrosis in arterial hypertension in the rat. *Cardiovasc Res* 26 (1992) 671-677
- Brodde O-E: Cardiac beta-adrenergic receptors. *ISI Atlas Sci: Pharmacol* 1 (1987) 107-112
- Butler AR, Flitney FW, Williams DLH: NO, nitrosonium ions, nitroxi-
de ions, nitrosothiols and iron-nitrosyls in biology: a chemists perspective. *Trends Pharmacol Sci* 16 (1995) 18-22
- Cros GH, Chanez PO, Michel A, Boncard M, Serrano JJ: Post-natal evolution of rat cardiac beta-adrenoceptors. *Life Sci* 43 (1988) 699-706
- Dinerman JL, Lorvenstein CJ, Snyder SH: Molecular mechanisms of Nitric Oxide regulation. Potential relevance to cardiovascular disease. *Circ Res* 73 (1993) 217-222
- Dooley DJ, Bittiger H, Reymann NC: CGP 20712 A: A useful tool for quantitating β_1 - and β_2 -adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* 130 (1986) 137-139
- Ecker T, Göbel C, Hullin R, Rettig R, Seitz G, Hofmann F: Decreased cardiac concentration of cGMP kinase in hypertensive animals. An index for cardiac vascularization? *Circ Res* 65 (1989) 1361-1369
- Flesch M, Kilter H, Cremers B, Lenz O, Südkamp M, Kuhn-Regnier F, Böhm M: Acute effects of Nitric Oxide and Cyclic GMP on Human myocardial contractility. *J Pharmacol Exp* 281 (1997) 1340-1349
- Förstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H: Nitric oxide synthase isozymes: characterization, molecular cloning and functions. *Hypertension* 23 (1994) 1121-1131

Foster KA, Hock CE, Reibel DK: Altered responsiveness of hypertrophied rat hearts to alpha- and beta-adrenergic stimulation. *J Mol Cell Cardiol* 23 (1991) 91-101

Fouad FM, Shimamatsu K, Hanna MM, Khairallah PA, Tarazi RC: Impaired inotropic responses to alpha-adrenergic stimulation in experimental left ventricular hypertrophy. *Circulation* 71 (1985) 1023-1028

Furchgott RF: Studies of relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: the basis for the proposal that the acid-activatable inhibitory factor from bovine retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. In: *Vasodilatation: Vascular smooth muscle, peptides, autonomic nerves and endothelium*, Hrsg. Vanhoutte PM, New York: Raven, 1988, 401-414

Furchgott RF, Zawadzki JV: The obligatory role of endothelium cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288 (1980) 373-376

Fujisaki H, Ito H, Hirata Y, Tanaka M, Hata M, Lin M, Adachi S, Akimoto F, Marumo F, Hiroe M: Natriuretic peptides inhibit angiotensin II-induced proliferation of rat cardiac fibroblasts by blocking endothelin-1 gene expression. *J Clin Invest* 96 (1995) 1059-1065

Grocott-Mason R, Anning P, Evans H, Lewis MJ, Shah AM: Modulation of left ventricular relaxation in isolated ejecting heart by endogenous nitric oxide. *Am J Physiol* 267 (1994) H1804-1813

Inui J, Brodde O-E, Schümann HJ: Influence of acetylcholine on the positive inotropic effect evoked by alpha- or beta-adrenoceptor stimulation in the rabbit heart. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 320 (1982) 152-159

Ito N, Bartunek J, Spitzer KW, Lorell BH: Effects of nitric oxide donor sodium nitroprusside on intracellular pH and contraction in hypertrophied myocytes. *Circulation* 95 (1997) 2303-2311

- Jalil JE, Janicki JS, Pick R, Weber KT: Coronary vascular remodeling and myocardial fibrosis in the rat with renovascular hypertension: Response to Captopril. *Am J Hypertens* 4 (1991) 51-55
- Kelly RA, Balligand J-L, Smith TW: Nitric oxide and cardiac function. *Circ Res* 79 (1996) 363-380
- Lohmann SM, Fischmeister R, Walter U: Signal transduction by cGMP in the heart. *Basic Res Cardiol* 86 (1991) 503-514
- Mann JFE, Jakobs KH, Riedel J, Ritz E: Reduced chronotropic responsiveness of the heart in experimental uremia. *Am J Physiol* 250 (1986) H846-H852
- Manso AM, Encabo A, Redondo J, Salaices M, Marin J: Different sensitivity of isoprenaline-induced responses in ventricular muscle to sodium nitroprusside in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Auton Pharmacol* 20 (2000) 77-85
- Mertens MJF, Batink HD, Pfaffendorf M, van Zwieten PA: Impaired inotropic response to alpha-1 but not to beta-adrenoceptor stimulation in isolated hearts from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 10 (1992a) 143-148
- Mertens MJF, Mathy M-J, Pfaffendorf M, van Zwieten PA: Depressed inotropic response to beta-adrenoceptor agonists in the presence of advanced cardiac hypertrophy in hearts from rats with induced aortic stenosis and from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 10 (1992b) 1361-1368
- Mertens MJF, Pfaffendorf M, van Zwieten PA: Differential response of hypertrophied rat hearts to various alpha 1-adrenoceptor agonists. *Fundam Clin Pharmacol* 7 (1993) 93-101
- Mery PF, Pavoine C, Belhassen L, Pecker F, Fischmeister R: Nitric oxide regulates cardiac calcium current. Involvement of cGMP-inhibited and

cGMP-stimulated phosphodiesterases through guanylyl cyclase activation. *J Biol Chem* 268 (1993) 26286-26295

Michel JB, Salzman JL, Ossondo Nlom M, Bruneval P, Barres D, Camilleri JP: Morphometric studies of collagen network and plasma perfused capillary bed in the myocardium of rats during evolution of cardiac hypertrophy. *Basic Res Cardiol* 81 (1986) 142-154

Michel JB (Hrsg.): NO and cardiovascular homeostasis. Menarini International. Firenze 1996, S. 26

Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA: Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43 (1991) 109-142

Rambašek M, Ritz E, Mall G, Mels O, Katus H: Myocardial hypertrophy in rats with chronic renal insufficiency. *Kidney Int* 28 (1985) 775-787

Schmidt HH, Lohmann SM, Walter U: The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta* 1178 (1993) 153-175

Sen S, Tarazi RC, Khairallah PA, Bumpus FM: Cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* 35 (1974) 775-781

Shah AM, Lewis MJ, Henderson AH: Effects of 8-bromo-cGMP on contraction and on inotropic response of ferret cardiac muscle. *J Mol Cell Cardiol* 23 (1991) 55-64

Silberberg JS, Barre PE, Prichard SS, Sniderman AD: Impact of left ventricular hypertrophy on survival in end-stage renal disease. *Kidney Int* 36 (1989) 286-290

Smith HJ, Nuttall A: Experimental models of heart failure. *Cardiovasc Res* 19 (1985) 181-186

Smith JA, Shah AM, Lewis MJ: Factors released from endocardium of the ferret and pig modulate myocardial contraction. *J Physiol Lond* 439 (1991) 1-14

Smith TW, Balligand J-L, Kaye DM, Wiviott SD, Simmons WW, Xinqiang Han, Michel T, Krishna Singh, Kelly R: The Role of the NO Pathways in the Control of Cardiac Function. *J of Cardiac Failure* 2 (1996) S141-S147

Spitzer KW, Bridge JHB: Relationship between intracellular pH and tension development in resting ventricular muscle and myocytes. *Am J Physiol* 262 (1992) C317-327

Stiles GL, Caron MG, Lefkowitz RJ: Beta-adrenergic receptors: biochemical mechanisms of physiological regulation. [Review] *Physiol Rev* 64 (1984:661-743

Sun X, Wei S, Szabo C, Dusting GJ: Depression of the inotropic action of isoprenaline by nitric oxide synthase induction in rat isolated heart. *Eur J Pharmacol* 320 (1997) 29-35

Van Rossum JM: Cumulative dose-response curves. Technique for the making of dose-response curves in isolated organs and the evaluation of drug parameters. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 143 (1963) 299-330

Xiao R-P, Lakatta EG: β_1 -Adrenoceptor stimulation and β_2 -Adrenoceptor stimulation differ in their effects on contraction, cytosolic Ca^{2+} , and Ca^{2+} -current in single rat ventricular cells. *Circ Res* 73 (1993) 286-300

7 Abbildungen

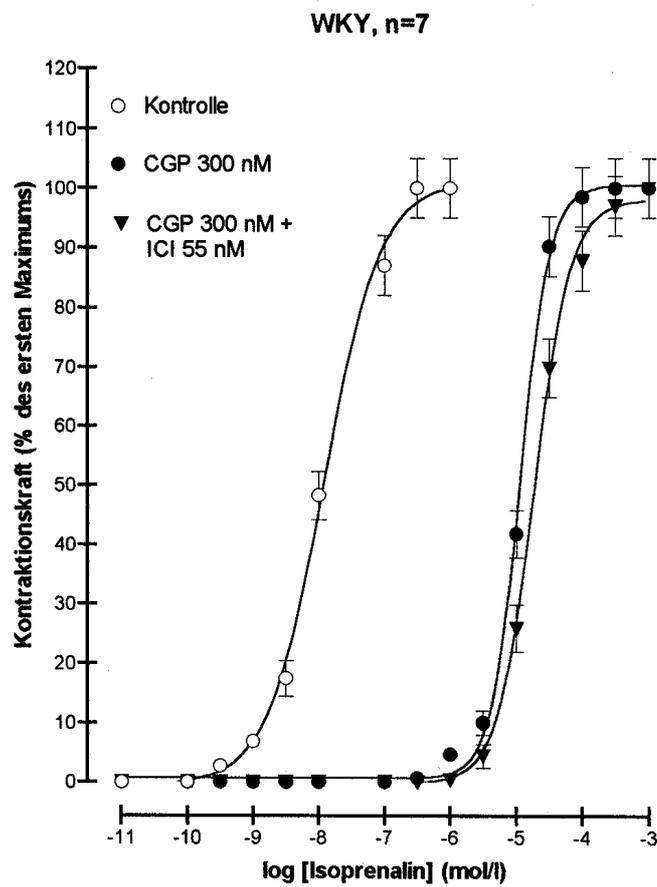


Abbildung 1: Einfluß von CGP 20712 A (300 nM) und CGP 20712 A (300 nM) plus ICI 118,551 (55 nM) auf die positiv inotrope Wirkung von Isoprenalin an Ventrikelstreifen von WKY-Ratten. Ordinate: positiv inotroper Effekt von Isoprenalin in Prozent der Maximalwirkung (=100%), Abszisse: Konzentration von Isoprenalin in mol/l.

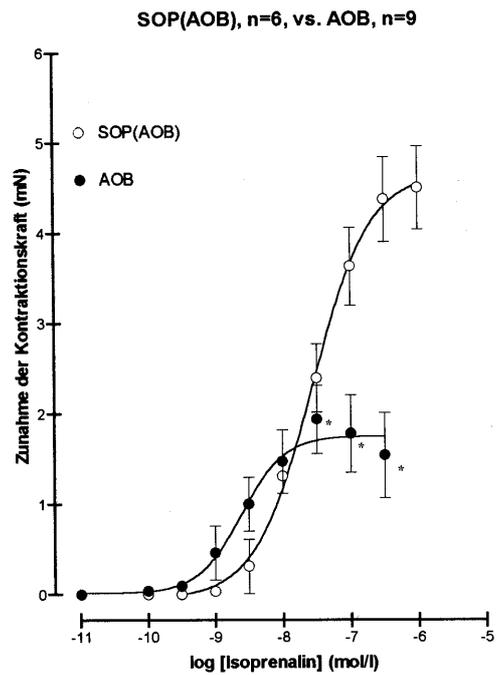
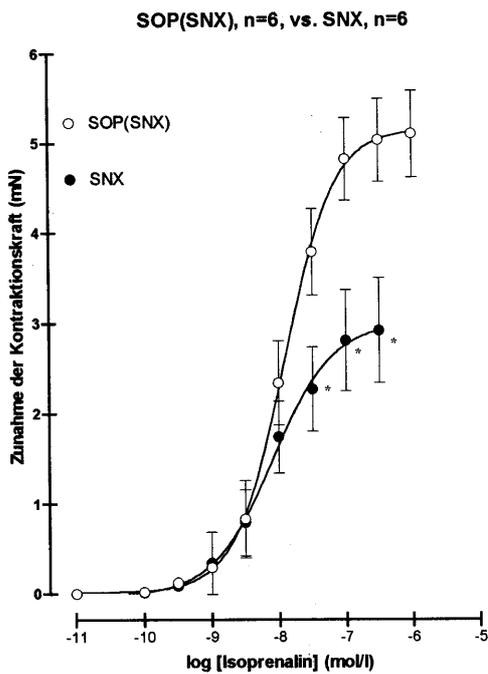
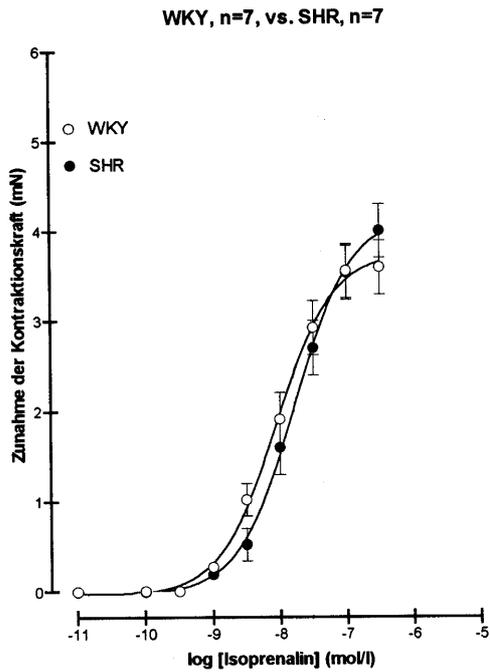


Abbildung 2: Die positiv inotrope Wirkung von Isoprenalin an Ventrikelstreifen von WKY-Ratte vs. SHR-, SOP(SNX)- vs. SNX- und SOP(AOB)- vs. AOB-Ratte. Ordinate: Zunahme der Kontraktionskraft der Ventrikelstreifen in mN, Abszisse: Konzentration von Isoprenalin in mol/l. *) $p < 0,05$

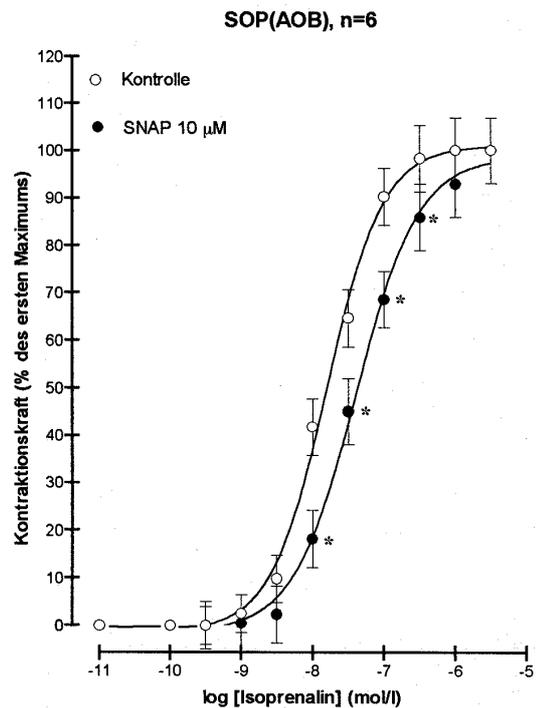
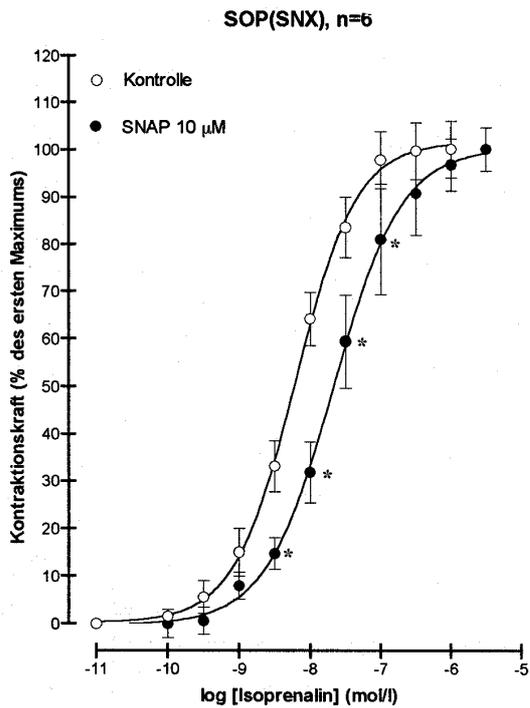
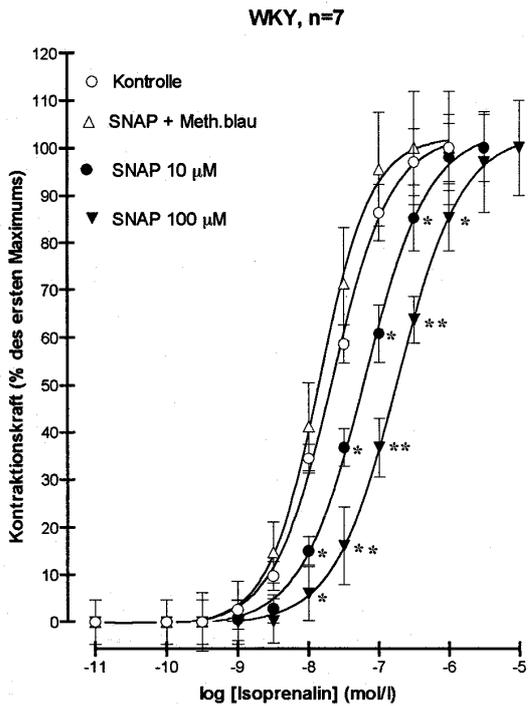


Abbildung 3: Einfluß von SNAP (10^{-5} M), von SNAP (10^{-4} M) bzw. von SNAP (10^{-5} M) plus Methylenblau (10^{-5} M) auf die positiv inotrope Wirkung von Isoprenalin an Ventrikelstreifen der WKY-, SOP(SNX)- und SOP(AOB)-Ratte. Ordinate: positiv inotroper Effekt von Isoprenalin in Prozent der Maximalwirkung (=100%), Abszisse: Konzentration von Isoprenalin in mol/l. **)p<0,01, *)p<0,05

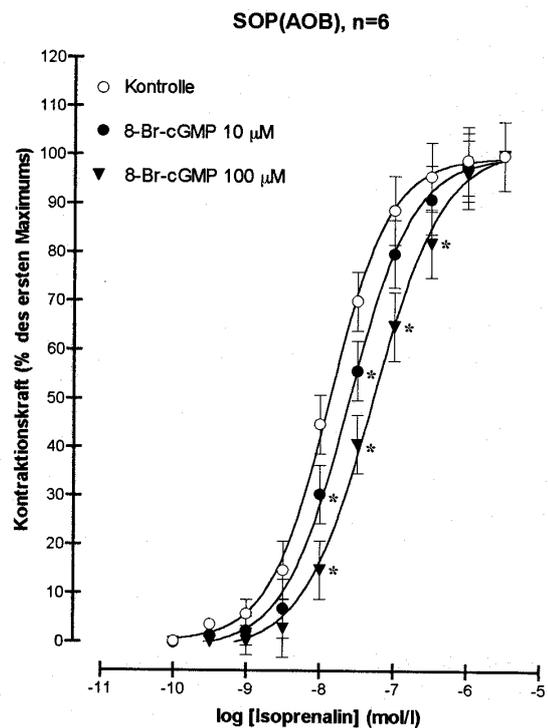
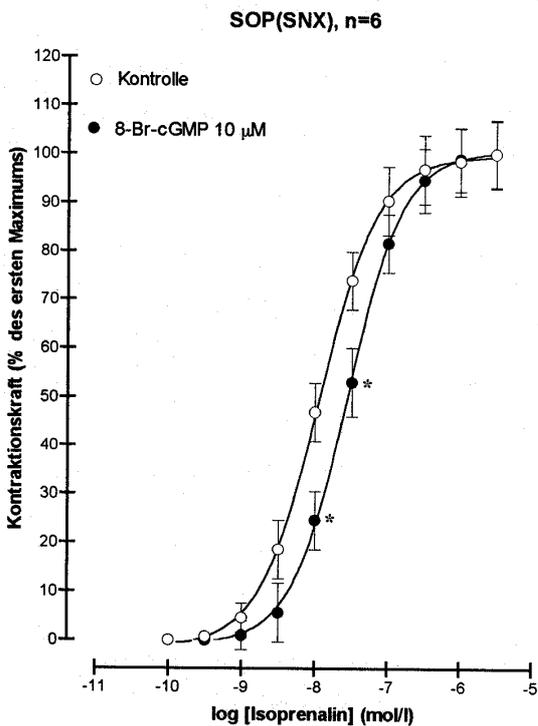
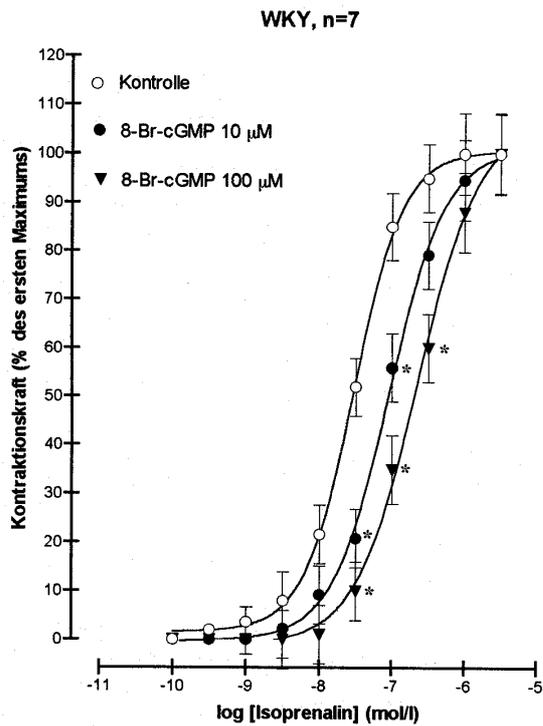


Abbildung 4: Einfluß von 8-Bromo-cGMP (10^{-5} M und 10^{-4} M) auf die positiv inotrope Wirkung von Isoprenalin an Ventrikelstreifen der WKY-, SOP(SNX)- und SOP(AOB)-Ratte. Ordinate: positiv inotroper Effekt von Isoprenalin in Prozent der Maximalwirkung (=100%), Abszisse: Konzentration von Isoprenalin in mol/l. *) $p < 0,05$

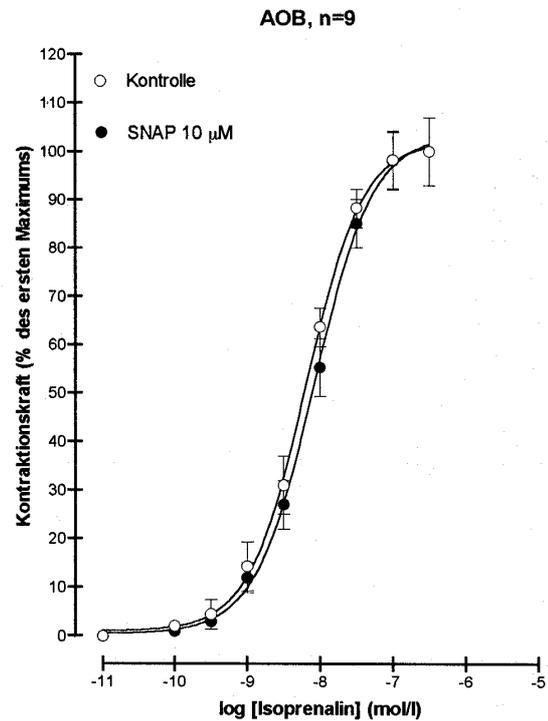
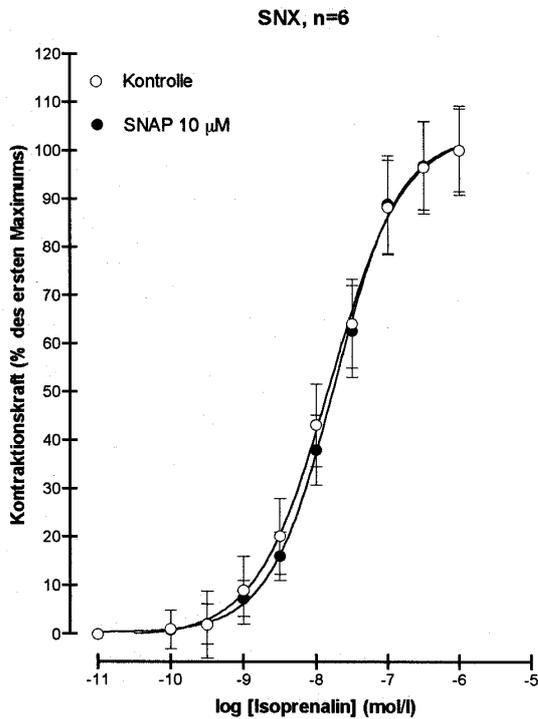
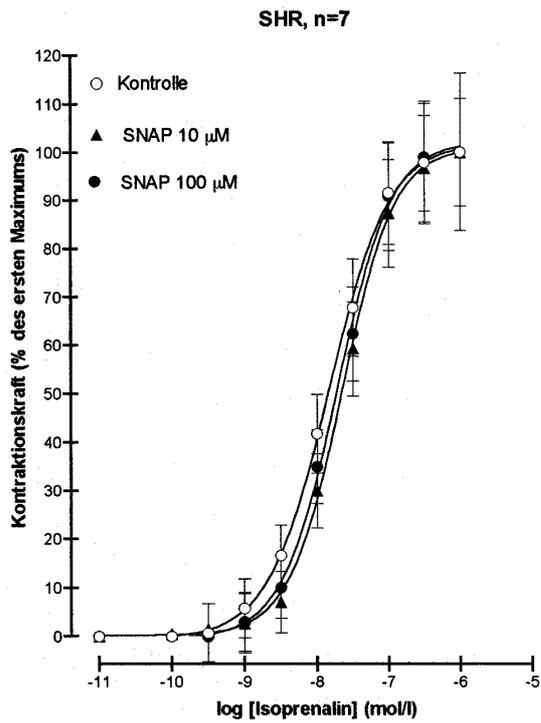


Abbildung 5: Einfluß von SNAP (10^{-5} M und 10^{-4} M) auf die positiv inotrope Wirkung von Isoprenalin an Ventrikelstreifen der SHR-, SNX- und AOB-Ratte. Ordinate: positiv inotroper Effekt von Isoprenalin in Prozent der Maximalwirkung (=100%), Abszisse: Konzentration von Isoprenalin in mol/l.

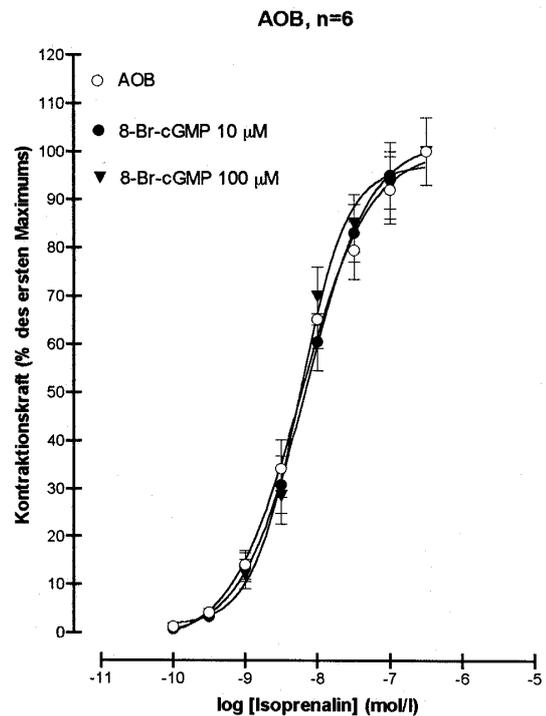
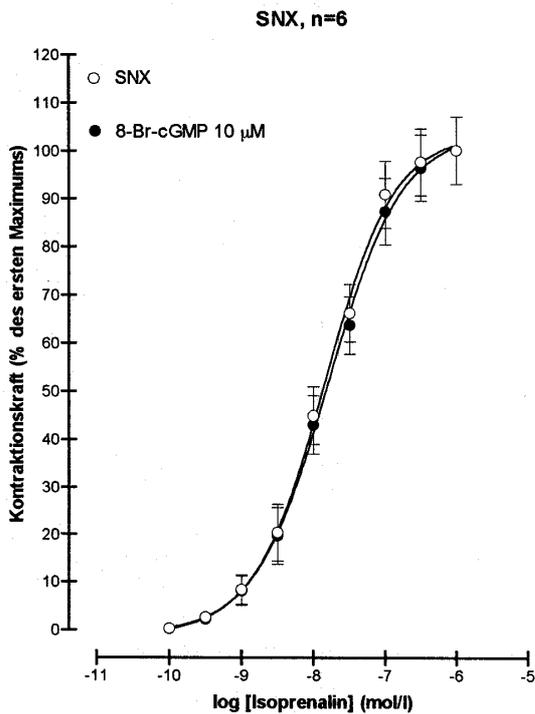
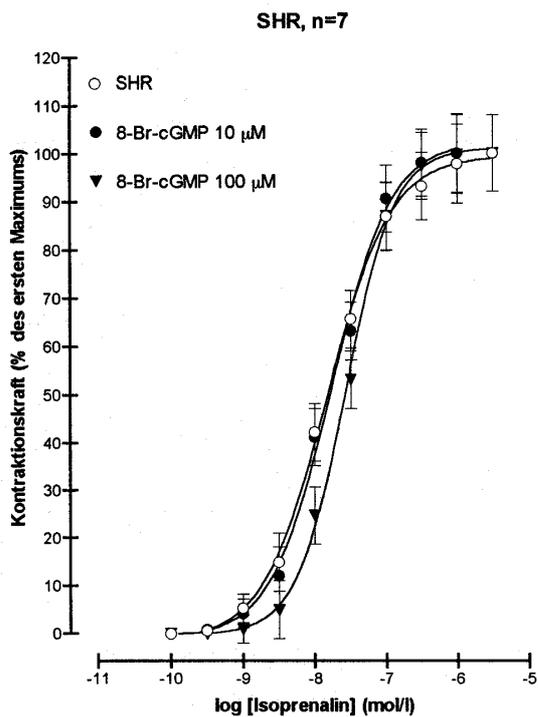


Abbildung 6: Einfluß von 8-Bromo-cGMP (10^{-5} M und 10^{-4} M) auf die positiv inotrope Wirkung von Isoprenalin an Ventrikelstreifen der SHR-, SNX- und AOB-Ratte. Ordinate: positiv inotroper Effekt von Isoprenalin in Prozent der Maximalwirkung (=100%), Abszisse: Konzentration von Isoprenalin in mol/l.

Lebenslauf

Tilman Wilhelm Weißelberg

Jungfernstieg 16 A

18437 Stralsund

Persönliche Daten

Geburtsdatum 25. Juli 1969

Geburtsort Erfurt

Familienstand ledig

Schulbildung

1976-80 Grundschule Azmannsdorf

1980-86 Oberschule Urbich

1986-88 Erweiterte Oberschule A. v. Humboldt in Erfurt, Abitur

1988-90 Grundwehrdienst

Studium

1990-92 Vorklinisches Studium der Humanmedizin an der Universität Leipzig

1992 Physikum

1992 bis November Klinisches Studium der Humanmedizin an der
Medizinischen Akademie Erfurt

1992-95 Klinisches Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-
Universität Halle-Wittenberg

1995 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

1996 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Weiterbildung

1996-97 Arzt im Praktikum an der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

1997 Experimentelle Promotionsarbeit

1997-98 Arzt im Praktikum an der Klinik für Innere Medizin der BG-Kliniken
Bergmannstrost, Halle

seit 1999 Assistenzarzt an der Klinik für Innere Medizin des Klinikums Stralsund

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich erkläre hiermit, daß ich außer der vorliegenden Arbeit keine weiteren Arbeiten zur Begutachtung als Dissertation an der Martin-Luther-Universität oder an anderen Universitäten eingereicht habe.

Stralsund, den 2.4.2001

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, daß ich die vorliegende Arbeit selbst verfaßt und keine anderen als die darin angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Stralsund, den 2.4.2001

Publikation von Ergebnissen dieser Arbeit

Kotchi Kotchi E, Weißelberg T, Röhnert P, Preiss M, Heinroth-Hoffmann I, Osten B, Brodde O.-E.: Nitric oxide inhibits isoprenaline-induced inotropic effects in normal, but not in hypertrophied rat heart. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 357 (1998): 579-583

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. rer. nat. O.-E. Brodde für die Überlassung des Themas und die hervorragende und geduldige Betreuung.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern des Labors für Isolierte Organe, die Arbeit in der einmaligen Atmosphäre war für mich eine große Bereicherung in jeder Hinsicht. Insbesondere danke ich Frau Dr. Heinroth-Hoffmann für die Einführung in die Operationstechnik, Herrn Dr. Kotchi Kotchi für die Heranführung an die Präparation der Ventrikelstreifen sowie Herrn Dr. Wulfhekel und Frau Reber für die Hilfe in der Datenverarbeitung.