

Aus dem Institut für Physiologie
der medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

„Die Wirkung von Katecholaminen auf die Koronararterien des Menschen“

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

Vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Agnes Jumar

aus Magdeburg

Gutachter/in:

1. Prof. Dr. med. G. Siegel
2. Prof. Dr. med. H. Hahmann
3. Prof. Dr. med. habil. M. Hanefeld

Datum der Promotion:

30.11.2012

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1 Einleitung	6
1.1 Herzinsuffizienz und neuroendokrine Aktivierung	6
1.2 Molekulare Steuerung katecholaminvermittelter koronarer Vasomotorik	7
1.3 Katecholaminerge Vasomotion bei Herzinsuffizienz	9
1.4 Zielsetzung der Arbeit	14
2 Methoden	15
2.1 Ein- und Ausschlusskriterien der Studie.....	15
2.2 Gewinnung des Untersuchungsmaterials.....	15
2.3 Aufbau der Versuchsapparatur	16
2.4 Aufbereitung der Koronarpräparate und Lösungen.....	17
2.5 Ermittlung der mechanischen Spannung	18
2.5.1 Versuchsablauf	18
2.5.2 Korrektur der Stress-Relaxation	18
2.5.3 Bestimmung der intrinsischen Blockeraktivität.....	19
2.6 Intrazelluläre Membranpotentialableitung.....	19
2.6.1 Versuchsaufbau, Mikroelektroden und Datenaufnahme.....	19
2.6.2 Intrazelluläre Platzierung der Elektroden	19
2.6.3 Konzentrationsbestimmung von cAMP und cGMP	20
2.7 Statistische Methoden.....	22
3 Ergebnisse	22
3.1 Eigenschaften der untersuchten Präparate	22
3.2 Kraft- und Potentialentwicklung	23
3.2.1 Verhalten in Krebslösung	23
3.2.2 Katecholamine	26
3.2.3 Wirkungsverteilung auf α - und β -AR.....	30
3.2.4 Intrinsische Aktivität der α - und β -Rezeptorantagonisten	30
3.2.5 Allgemeine Beobachtungen bei der selektiven Adrenorezeptorblockade	31
3.2.6 Gefäßtonus unter Phentolamin und Adrenalin.....	31

3.2.7	Gefäßtonus unter Propranolol und Adrenalin	31
3.2.8	Gefäßtonus unter Phentolamin und Noradrenalin	33
3.2.9	Gefäßtonus unter Propranolol und Noradrenalin	33
3.2.10	Gefäßtonus unter Phentolamin plus Propranolol und Adrenalin	35
3.2.11	Gefäßtonus unter Phentolamin plus Propranolol und Noradrenalin	35
3.3	Konzentration zyklischer Nukleotide	35
3.4	Betrachtung des Gesamtmodells	37
3.4.1	Katecholamine mit AR-Antagonisten.....	37
3.4.2	Chemomechanische Kopplung	38
3.4.3	Stationäre Aktivierungskurve	40
4	Diskussion	40
4.1	Katecholaminerge Einflüsse	40
4.1.1	Noradrenalin	41
4.1.2	Adrenalin	43
4.2	Beeinflussung durch Adrenorezeptorantagonisierung.....	44
4.2.1	Intrinsische Aktivität der AR-Antagonisten	44
4.2.2	Korrelation zwischen Tonus, Potential und zyklischer Nukleotidkonzentration....	45
4.2.3	α -Adrenorezeptor-Blockade	45
4.2.4	β -Adrenorezeptor-Blockade	48
4.2.5	α - und β -Adrenorezeptor-Blockade	49
4.3	Bedeutung von Vormedikation und interindividuellen Risikofaktoren.....	49
4.4	Betrachtung des Gesamtmodells	52
5	Zusammenfassung	53
	Literaturverzeichnis	56
	Lebenslauf	64
	Publikationsliste	64
	Danksagung	65
	Erklärung	66

Abkürzungsverzeichnis

α -AR	α -Adrenorezeptor
A	Adrenalin
AC	Adenylatcyclase
AR	Adrenorezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
β -AR	β -Adrenorezeptor
BVAD	biventricular assist device
cAMP	zyklisches Adenosin - 3', 5'-monophosphat
cA-PK	cAMP abhängige Proteinkinase
cGMP	zyklisches Guanosin - 3', 5'-monophosphat
cG-PK	cGMP abhängige Proteinkinase
DAG	Diacylglycerin
EF	Ejektionsfraktion
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ICD	Implantable Cardioverter Defibrillator
IP ₂	Inositoldiphosphat
IP ₃	1, 4, 5 Inositoltrisphosphat
KCl	Kaliumchlorid
KG	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzkrankheit
LVAD	left ventricular assist device
MLCK	Myosinleichtkettenkinase
MLCP	Myosinleichtkettenphosphatase
NA	Noradrenalin
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthetase
NYHA	New York Heart Association
PH	Phentolaminhydrochlorid
PI	Phosphatidylinositol
PKC	Proteinkinase C
PR	Propranololhydrochlorid
SEM	standard error mean
SNP	Nitropussidnatrium
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TMB	3,3', 5,5'- Tetramethylbenzidin
VLDL	very low density lipoprotein

1 Einleitung

1.1 Herzinsuffizienz und neuroendokrine Aktivierung

In einer Gesellschaft mit steigender Lebenserwartung kommt der Beschäftigung mit der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz besondere Bedeutung zu [23, 61]. Bereits im Jahr 2006 war die Herzinsuffizienz mit deutschlandweit 317 000 stationär therapierten Fällen die häufigste Ursache eines stationären Krankenhausaufenthalts [61, 77]. Während im Alter zwischen 45 und 55 Jahren weniger als 1 % der deutschen Bevölkerung an einer Herzinsuffizienz leiden, erkranken zwischen dem 65. und 75. Lebensjahr bereits 2 – 5 % und bei den über 80-Jährigen fast 10 % der Bevölkerung [50, 77]. Die koronare Herzkrankheit (KHK) stellt dabei in westlichen Ländern mit 54 bis 70 % die häufigste Ursache myokardialer Insuffizienz dar [22, 77].

Zusätzlich zu einer pathologischen Hämodynamik zeigt sich bei herzinsuffizienten Patienten eine myokardiale Hypoxie, welche aus einer verminderten Koronarperfusion aufgrund verkürzter Diastolendauer und/oder der Aktivierung einer neurohormonellen und renalen Dysfunktion resultiert [65]. Auf der Basis dieser myokardialen Schädigung kommt der lokalen und systemischen neuroendokrinen Aktivierung in der Pathophysiologie des ventrikulären Remodeling entscheidende Bedeutung zu [4, 8, 65]. Ebenso kann koronar-arterioläre Dysfunktion ursächlich zu kardialer Ischämie, Herzinsuffizienz und einer Transplantation führen [65].

Anhand von Studien an isolierten Koronararterien aus Herztransplantationen konnten bereits Mechanismen verstanden werden, die die adäquate Blutzufuhr für den Herzmuskel durch die Feinregulation des koronaren Gefäßtonus steuern [14, 28, 29, 54, 65]. An dieser Feinregulation sind die körpereigenen Katecholamine sowie die α - und β -Adrenorezeptoren (AR) maßgeblich beteiligt [28, 78, 83, 90]. Katecholamine werden im Stadium der akuten terminalen Herzinsuffizienz seit langem als Überbrückung zur Transplantation, zur Blutdruckstabilisierung und zur Inotropiesteigerung eingesetzt [11, 45, 47], ohne die Detailwirkung unterschiedlicher Konzentrationen auf den koronararteriellen Tonus des Menschen zu kennen. Zudem stehen potentielle neue therapeutische Optionen für die Therapie der Herzinsuffizienz, wie Endothelin- und TNF α -Antagonisten [22, 38], in enger Verbindung zur katecholaminerg gesteuerten Signaltransduktion [49]. Ihr Signaling über G-Proteine involviert die Messengermoleküle cAMP und cGMP. Eine im Juni 2011 veröffentlichte Studie zur erfolgreichen Prävention der Herzinsuffizienz durch vagale Stimulation lässt keinen Zweifel an der pathophysiologischen Bedeutung eines hohen Sympathikotonus bei herzinsuffizienten Patienten [21]. Die selektive AR-Antagonisierung erlaubt anhand des Vasotonus nicht nur Rückschlüsse auf die Verteilung der

Adrenorezeptoren und ihrer Subtypen, sondern ermöglicht zugleich ein besseres Verständnis der Wirkung der physiologischen Rezeptoragonisten Adrenalin (A) und Noradrenalin (NA).

1.2 Molekulare Steuerung katecholaminvermittelter koronarer Vasomotorik

Es ist bekannt, dass die Katecholamine A und NA im Verhältnis 4 : 1 aus dem Nebennierenmark sezerniert werden, wobei im Gegensatz zu A nur 5 % der NA-Produktion des Körpers im Nebennierenmark stattfindet [50]. Die in der *Formatio reticularis* produzierten übrigen 95 % erreichen das Gefäßsystem über terminale Nervenendigungen [50, 68]. Dabei verlaufen die sympathischen Fasern für die koronararterielle Innervation an der Adventitia-Media-Grenze und nehmen in ihrer Innervationsdichte zu den Kapillaren hin ab [6, 51, 68]. Sie weisen zudem zahlreiche Varikositäten auf, die mit der Plasmamembran der glatten Gefäßmuskulatur variable synaptische Strukturen ausbilden [68]. Die aus den Vesikeln freigesetzte NA-Menge hängt sowohl von der Frequenz der Aktionspotentiale als auch von lokal-chemischen Einflüssen und Substanzen ab [68]. Die zu dem Sezernierungsverhältnis aus dem Nebennierenmark inversen Plasmaspiegel (A : NA = 1 : 5) werden durch den Abtransport von NA (spillage) von den tonisch-aktiven sympathischen Nervenendigungen der Gefäßwand in das Blut hervorgerufen [65]. 80 % des bei der Erregung eines Vasokonstriktor-neurons freigesetzten NA werden wieder aktiv in die Varikositäten aufgenommen [65, 68]. Die Plasmakonzentration von NA kann daher als ein indirektes Maß der efferenten sympathischen Impulsaktivität gewertet werden.

Beide Katecholamine steuern die Tonusregulation der glatten Gefäßmuskulatur in der Koronararterie über verschiedene Adrenorezeptor-Zielmoleküle [90]. Es ist bekannt, dass sich die Glykopeptidstruktur der Katecholaminrezeptoren durch eine heptahelikale Transmembranstruktur mit extrazellulärer Rezeptorbindungsstelle und einer intrazellulären G-Protein-Kopplung auszeichnet [68]. Die Bindung eines Rezeptormoleküls führt zur Abspaltung der γ -Untereinheit des G-Proteins mit nachfolgender Signaltransduktion [68]. Über die Konzentrationsänderung zyklischer Nukleotide kommt es zur Membranpotentialveränderung und anschließender Tonusvariation. Wie im Folgenden dargestellt sind die mittels ELISA in Koronararterien bestimmbaren Messengermoleküle cAMP und cGMP als Indikatoren für den Tonus der glatten Muskelzelle von entscheidender Bedeutung [55].

In schmalen Arterien und Arteriolen mit nur rudimentär entwickeltem SR spielt der bleibende Ca^{2+} -einwärts-Strom über potentialabhängige Ca^{2+} -Kanäle die dominierende Rolle bei der spannungsabhängigen Kontraktion [68]. Eine glatte Muskelzelle besitzt mehr als 1000 spannungsabhängige

Ca²⁺-Kanäle, die sich mit der Depolarisation öffnen und bei Hyperpolarisation schließen [68]. Dabei wächst der Ca²⁺-Einstrom exponentiell mit der Depolarisation und die intrazelluläre Kalziumkonzentration steigt von 0,2 µmol/L auf 0,5 – 1,8 µmol/L [68]. Das Verhältnis zwischen Membranpotential und Öffnungswahrscheinlichkeit dieses Kanals ist dem Verhältnis zwischen Membranpotential und agonist-induzierter Kraftentwicklung vergleichbar [56]. Membrandepolarisation korreliert mit Vasokonstriktion, Membranhyperpolarisation mit Vasodilatation [57, 59]. Eine Depolarisation von 2 – 3 mV resultiert durch das Schließen des spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanals in einer 50 %igen Reduktion des Gefäßtonus [68]. Die Steuerung der Kalziumkanäle obliegt dem Membranpotential und den Rezeptoragonisten wie Neurotransmittern und Hormonen [7, 65]. Potentialwellen gehen dabei den rhythmischen Tonusänderungen um 40 ms voraus [68].

Bei der Membrandepolarisation und Vasokonstriktion nach α -Rezeptor Aktivierung handelt es sich um ein multifaktorielles Ereignis. Die Signaltransduktion bei α_1 -Rezeptoren-Stimulation involviert die G-Protein vermittelte Aktivierung der Phospholipase C und die Bildung von DAG und IP₃ [86]. Die DAG-aktivierte PKC phosphoryliert spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle, was zu einem gesteigerten Ca²⁺-Einstrom und einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration führt [60]. Der Ca²⁺-Einstrom, ein Cl⁻-Ausstrom über Ca²⁺-abhängige Chloridkanäle und der einwärts gerichtete Na⁺-Strom depolarisieren die Zellmembran [68]. Die G-Protein unabhängige Hemmung des K_{Ca}-Kanals trägt ebenfalls zur Membrandepolarisation bei [68]. Die präsynaptische α_2 -AR-vermittelte Hemmung der NA-Freisetzung wird über die Aktivierung des Adenylatzyklase (AC) gebundenen inhibitorischen G-Proteins (G_i) bewirkt [68]. Im Falle der Kontraktion sinkt der intrazelluläre cAMP-Spiegel [9].

Die am Ende der Signaltransduktion für die Kontraktion verantwortliche Phosphorylierung der Myosinleichtkette hängt nicht nur von der Ca²⁺-Konzentration, sondern auch von der Myosinleichte-Ketten-Phosphatase (MLCP) ab [48]. Sowohl die Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Phosphorylierung der Myosinleichtkette mittels Myosinleichtkettenkinase (MLCK), als auch die Dephosphorylierung mittels MLCP sind wichtige Regulationsmechanismen bei der Tonuserstehung [65]. Die Ca²⁺/Calmodulin-Aktivierung der MLCK kann inhibiert werden, wenn dieses Enzym durch die cAMP-abhängige Proteinkinase (cA-PK) an der Domäne A phosphoryliert wird [15, 68]. Dieser Mechanismus erklärt die cAMP-vermittelte Relaxation nach Stimulation vaskulärer β_2 -AR durch Adrenalin [48]. Des Weiteren bewirkt ein Anstieg von cAMP ein Absinken der zytosolischen Kalziumkonzentration [68]. Beides vermindert den Grad der Phosphorylierung der Myosinleichtkette. Hingegen verursacht cGMP keine Ca²⁺/Calmodulin Aktivierung, da die cG-PK-

abhängige Phosphorylierung von Domäne B der MLCK den Ca^{2+} /Calmodulin-Komplex nicht beeinflusst [68].

Nach Aktivierung durch einen Agonisten stimulieren die zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP die Ca^{2+} -ATPase im Plasmalemma [68], um in die Zelle diffundierende Ca^{2+} -Ionen wieder aktiv durch eine ATP-abhängige Ca^{2+} -Pumpe und den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher aus der Zelle zu befördern. Somit wird der transmembranäre Kalziumgradient aufrecht erhalten. Die β -AR sind über stimulatorische G-Proteine (G_s) mit dem AC-System gekoppelt und steigern den intrazellulären cAMP-Gehalt [48]. Die molekulare Basis dieses Effektes beruht auf einer Phosphorylierung von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen, die einen verminderten Ca^{2+} -Einstrom zur Folge hat, und der Phosphorylierung von verzögerten Gleichrichter- und Ca^{2+} -aktivierbaren K^+ -Kanälen, die zu einer K^+ -Kanalöffnung führt [68]. Diese Mechanismen bewirken eine Hyperpolarisation der glatten Muskelzelle, die den $\text{I}_{\text{Ca,S}}$ -Kanal schließt [68]. Das Absinken der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration in der glatten Muskelzelle führt zu einer Verminderung der Aktivität der Myosinkinase und somit zur Relaxation [68].

Der Kontraktionszustand der glatten Muskulatur wird über einen zweiten Mechanismus verändert, bei dem die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) die Myosinkinase phosphoryliert, was zu einer Änderung der Affinität zum Kalzium-Calmodulin-Komplex führt [68]. Es werden jetzt wesentlich höhere Konzentrationen des Kalzium-Calmodulinkomplexes benötigt, um von der inaktiven in die aktive Form überzugehen. Das hat zur Folge, dass die bei Erregung der glatten Muskulatur auftretende Konzentrationszunahme an freien Kalziumionen nicht mehr zur Auslösung eines Kontraktionsvorgangs ausreicht [48].

1.3 Katecholaminerge Vasomotion bei Herzinsuffizienz

In vitro Untersuchungen an koronararteriellem Material vom Menschen und verschiedenen Säugetieren ermöglichen Einblicke in die Pathophysiologie der beschriebenen Mechanismen bei Herzinsuffizienz [29, 78]. Es konnte mehrfach gezeigt werden, dass die Vitalität der Präparate bei Inkubation in carbogenisierter Krebslösung erhalten bleibt [28, 66]. Methoden der Rezeptoranfärbung dienen der Analyse der Ursache-Wirkungsbeziehung [18], und ein Ausschalten der systemischen Gegenregulationen ist von Vorteil für das Detailverständnis der lokalen Pathophysiologie [78]. Die Studienergebnisse an Kaninchen [20, 23, 42, 59] und Ratten [57, 63] sind jedoch sehr heterogen. Besonders zeugt das gegensätzliche Verhalten von Koronararterien des Schweins

[75, 87] und Hundes [2, 8, 44, 84, 88] davon, dass Rückschlüsse auf das Verhalten menschlicher Herzkranzgefäße aus tierexperimentellen Ansätzen nur sehr bedingt möglich sind.

Mögliche Ursachen für die erhebliche Studienheterogenität an Koronararterien des Menschen stellen neben individuellen Polymorphismen [9, 18, 58, 59] und Vorerkrankungen des Patienten vorherige iatrogene Eingriffe dar [13, 21, 35]. *Euteneuer* zeigte an 94 gesunden Probanden, dass ein niedriger sozialer Status mit einer verminderten β -AR-Ansprechbarkeit korreliert [27]. Auch ein differentes Wirkprofil an gleicher Stelle angreifender Pharmaka trägt zur Heterogenität der Resultate bei [78]. Eine kompensatorische Dilatation durch Shear-Stress [78] wurde genauso wie der Grad der Arteriosklerose bzw. das Alter und Geschlecht des Patienten als Ursache divergenter Studienergebnisse postuliert [6, 24, 58]. So überwiegt bei Erwachsenen - vermutlich arteriosklerotisch bedingt - eine α -adrenerge Kontraktion, während NA bei Kindern hauptsächlich β -AR stimuliert [6]. Dies macht die Notwendigkeit einer Analyse des Gefäßtonus im Referenzmedium Krebslösung in Abhängigkeit von Alter, Vormedikation des Patienten [7, 11] und Arteriosklerosegrad der Gefäße deutlich [23]. Diskutiert wird in der Literatur eine Feedforward-Kopplung, die über eine verstärkte NA Ausschüttung zu α -AR-Aktivierung führt [16, 52]. Letztere soll zudem eine Endothelinfreisetzung stimulieren [52]. Vor diesem Hintergrund erscheinen *in vitro* Experimente an isoliertem Koronarmaterial sinnvoll. Inwieweit eine schwer kalkulierbare Tonusänderung durch spontane Entleerung von NA-Vesikel in den terminalen Nervenendigungen stattfindet, bleibt kritisch zu prüfen.

Die endogene NA-Ruheausschüttung ist von einer Vielzahl unterschiedlicher Faktoren wie beispielsweise Geschlecht, Rasse und kardialer Vorerkrankung abhängig [1, 24, 50]. Ein 6-monatiges körperliches Trainingsprogramm senkte bei Patienten mit KHK die NA-Plasmakonzentration in Ruhe signifikant von $3,2 \cdot 10^{-6}$ mol/L auf $2,6 \cdot 10^{-6}$ mol/L bei 80 W von $4,8 \cdot 10^{-6}$ mol/L auf $3,5 \cdot 10^{-6}$ mol/L [79]. Es ist zudem bekannt, dass die NA-Plasmakonzentration mit zunehmender Herzinsuffizienz steigt [91]. Der Noradrenalin Spiegel im Plasma hat besonders in der Endphase der Herzinsuffizienz prognostische Bedeutung für die 2-Jahres-Überlebensrate. NYHA III herzinsuffiziente Patienten weisen mit $3,7 \cdot 10^{-6}$ mol/L eine signifikant höhere NA-Plasmakonzentration auf als Patienten im Stadium NYHA I mit $2,2 \cdot 10^{-6}$ mol/L [91].

Es konnte mehrfach gezeigt werden, dass die Effektivität von A mit zunehmender Herzinsuffizienz abnimmt [6, 58]. Für das Myokard wurde eine verminderte Ansprechbarkeit von β_1 -AR berichtet [89]. Koronar soll ein Teil der β_2 -AR von der AC entkoppelt werden, was einen Verlust ihrer vaso-

dilatatorischen Wirkung nach sich zieht [58]. Auch eine Abnahme der Empfindlichkeit von β_1 -AR liegt vor [37, 58, 65]. Während bis zu einer Adrenalkonzentration von $5 \cdot 10^{-6}$ mol/L der Hauptteil der Dilatation über β_2 -AR bewirkt wird, so überwiegt bei höheren Konzentrationen die β_1 -AR vermittelte Dilatation [6, 58]. Der erhöhte basale Gefäßtonus in arteriosklerotischen Koronararterien konnte einer stärkeren α_1 -AR-Aktivierung zugeschrieben werden. Außerdem wurde neben der endothelialen Dysfunktion [51, 67, 73] mehrfach eine verminderte β -AR-Wirkung bei Arteriosklerose bestätigt [5, 65]. Auch die präsynaptischen α_2 -AR, die die NA-Freisetzung limitieren, desensitivieren bei chronischer Stimulation unter Herzinsuffizienz [33].

Die geschilderten Veränderungen lassen Besonderheiten im Tonusverhalten der Koronararterien aus Herztransplantationen im Vergleich zu gesunden Koronargefäßen erwarten. Die gewählte Studienpopulation weist daher Homogenität im Bezug auf die Diagnose einer transplantationspflichtigen Herzinsuffizienz NYHA IV auf. Für die Einteilung in unterschiedliche Kategorien sorgte neben Erkrankungen mit Einfluss auf die endogene Katecholaminausschüttung das Vorhandensein von KHK und arteriosklerotischen Plaques im verwendeten Koronarmaterial.

Bisherige Arbeiten zeigen, dass die koronare AR-Verteilung erheblichen Einfluss auf die rezeptor-gesteuerten katecholaminergen Effekte hat [64, 90]. Der koronare Gefäßtonus wird über eine Balance zwischen α -adrenerger Vasokonstriktion und β -adrenerger Vasodilatation gesteuert [6, 52, 62, 68]. In gesunden und insuffizienten Koronararterien werden β_1 - und β_2 -AR auf Endothel und glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert, während die Verteilung von β_3 -AR auf das Endothel beschränkt ist [22, 78]. Ein vasodilatativer Effekt unter α -AR-Blockade an Koronararterien des Menschen konnte in zwei unabhängigen *in vivo* Studien bestätigt werden [8, 36, 39]. Mittels selektiver Rezeptorsubgruppenblockade kamen die Autoren zu dem Schluss, dass sowohl postsynaptische α_1 -AR als auch präsynaptische α_2 -AR an der durch NA induzierten Vasokonstriktion beteiligt sind [8]. Zu Vorkommen und Dominanz der einzelnen α -AR-Subtypen divergiert die Studienlage. Postuliert wurde sowohl eine generell dominierend α_2 -AR vermittelte Vasokonstriktion [9, 39], als auch eine Präsenz der Subtypen in Abhängigkeit vom Arteriosklerosegrad des Gefäßes (α_1 -AR bei gesunden Koronararterien, α_1 - und α_2 -AR an arteriosklerotischen Gefäßen) [9]. Über eine mögliche Änderung der α -AR-Verteilung bei Herzinsuffizienz, besonders unter dem Einfluss einer lange anhaltenden, hohen endogenen Sympathikusaktivität, liegen bisher noch keine Studien vor.

Zur β -AR-Verteilung existieren ebenfalls kontroverse Studienergebnisse. Mittels Fluoreszenzmarkierung [18] und β -AR-Subtyp-Antagonisierung [29] konnte ein glattmuskulärer Anteil von

70 % β_1 -AR an der Gesamtzahl der β -AR bestimmt werden. Mittels Radioligandenbindung ergab sich eine annähernd gleiche prozentuale Verteilung von 48 ± 5 % β_1 - und 52 ± 4 % β_2 -AR [54]. Mit wachsendem Gefäßdurchmesser wurde eine Zunahme der β_1 -AR im Vergleich zur Gesamtzahl der β -AR postuliert [78]. Im Gegensatz dazu zeigten Arteriolen mit einem Gefäßdurchmesser $> 50 \mu\text{m}$ aus insuffizienten Herzen eine stärkere β_2 -AR-Antwort [78].

Unterschiedliche Ergebnisse zwischen Fluoreszenzmarkierung bei gesunden Koronararterien [18] und Radioligandenbindung bei Koronararterien aus Herzinsuffizienz [54] werfen die Frage nach der Verfahrensspezifität auf, die erst bei genauerer Kenntnis der Sättigungskinetik der AR beantwortet werden kann. Es liegt die Schlussfolgerung nahe, dass gesunde Koronararterien im Vergleich zu Gefäßen bei Herzinsuffizienz einen höheren glattmuskulären Anteil an β_1 -AR aufweisen. Dies ginge einher mit einer myokardialen Herunterregulation der AR-Verteilung zugunsten der β_2 -AR bei terminaler Herzinsuffizienz [66]. Vorliegende Arbeit leistet einen Beitrag zum Verständnis der Kinetik koronarer AR nach katecholaminerger Stimulation. Anhand von Dosiswirkungskurven für A und NA werden erstmals ohne Stimulation der Signaltransduktion, also ohne Applikation unphysiologischer Pharmaka, Erregungsschwellenwerte sowie EC_{50} -Angaben herzinsuffizienter Koronararterien ermittelt.

Rezeptormodulatorische Einflüsse einer medikamentösen Therapie vor Herztransplantation sind in vorherigen Studien mit unterschiedlichen Pharmaka mehrfach nachgewiesen worden [17]. So wurde für Betablocker sowohl eine Adaptation der Betarezeptoren in Form einer verminderten katecholaminergen Sensitivität oder einer Reduktion der Rezeptordichte als auch eine verstärkte Stimulation durch Kreuzsensitivierung beschrieben [52]. Die molekulare Grundlage fußt auf der Phosphorylierung des aktivierten β -AR, welche zu einer Bindung von β -Arrestin führt. Dadurch wird eine weitere G-Protein-Bindung verhindert und die Desensitivierung des Rezeptors bewirkt [85]. Der phosphorylierte β -AR wird internalisiert und durchläuft einen Resensitivierungsprozess mittels Dephosphorylierung, der durch die Proteinphosphatase 2A im frühen Endosom bewerkstelligt wird [85]. Die funktionelle Entkopplung der myokardialen β -AR bei Herzinsuffizienz wurde daher auf eine erhöhte Konzentration der β -AR-Kinase zurückgeführt. Der Verlust von 50 % der β -AR, vor allem des β_1 Subtyps, schränkte die flussgesteuerte Dilatation ein [52].

Im Gegensatz dazu wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine Betablockergabe über Kreuzsensitivierung des β_2 -AR zusätzlich zu einer verstärkten koronaren Dilatation führen könnte [29]. Die therapeutische Behandlung mit β_1 selektiven AR-Blockern bei Herzinsuffizienz hätte so eine

zusätzliche über β_2 -AR Sensitivierung vermittelte vasodilatatorische Komponente [29]. Auch bei chronischer β -Agonisten-Stimulation, wie sie im Rahmen einer hohen endogenen NA-Konzentration bei Herzinsuffizienz vorkommt, gibt es Hinweise auf einer β_2 -Kreuzsensitivierung zur pathophysiologischen Kompensation [5, 52]. *In vivo* wurde an Patienten mit stabiler Angina pectoris ohne Herzinsuffizienz eine gesteigerte koronare NA-Freisetzung bei Salbutamolapplikation festgestellt [62]. Gegen die Kreuzsensitivierung spricht, dass der β_2 -AR über mehr sensitive Bereiche für eine Phosphorylierung verfügt als der β_1 -AR [29]. Eine Phosphorylierung von α - und β -AR geht einher mit einer Desensitivierung, einem Mechanismus dynamischer Regulation, bei dem die Empfindlichkeit gegenüber katecholaminerger Stimulation herabgesetzt wird [46]. Eine chronische β_1 -AR Aktivierung könnte so über eine verminderte Kopplung des β_2 -AR an das Gs-Protein – möglicherweise über eine PKA induzierte Phosphorylierung des Gs Proteins – zur β_2 -Desensitivierung beitragen [52].

Der Einfluss von NA wurde bisher nur ungenügend und mit sehr heterogenen Studienergebnissen an Koronararterien aus Herztransplantationen bei Patienten mit Betablockervormedikation untersucht. Die durch NA aktivierten β -AR auf Koronararterien sollen zu einer „Feedforward-Kopplung“ von Metabolismus und adrenerger Antwort führen [53]. Dies hätte über eine verstärkte NA-Ausschüttung eine erneute Aktivierung von α -AR und eine damit verbundene Vasokonstriktion zur Folge [53]. Beobachtet wurde eine verstärkte konstriktorische Antwort von isolierten koronaren Arteriolen des Kaninchens nach Phenylephrinapplikation [82]. Als Erklärung diente eine erhöhte NA-Freisetzung im Herzmuskel sowie eine gesteigerte Endothelinfreisetzung in der Koronararterie [82].

Ferro et al. [29] fanden an deendothelialisierten Koronarringen von Patienten mit β_1 -AR-Blockermedikation eine β_2 -adrenerge Sensitivierung. Diese führte zu einem relaxierenden Effekt unter NA. Allerdings blockierten die Autoren vor Versuchsbeginn alle α -AR irreversibel, was die Aussage über eine physiologische Reaktion auf NA erschwert. *Sun et al.* [78] zeigten 2002 an herzinsuffizienten Patienten eine NA-vermittelte Vasodilatation [78]. Leider finden sich keine Hinweise zu einer β -AR-modifizierenden Vormedikation der Patienten.

Schwinger et al. [66] fanden *in vitro*, dass A in den Konzentrationen $3 \cdot 10^{-7}$ bis $3 \cdot 10^{-4}$ mol/L keinen direkten vasodilatatorischen Einfluss hat. Die herzinsuffizienten Patienten waren weder mit Betablockern noch Katecholaminen prämediziert. Sie postulierten daher, dass die Effektivität von A insofern vom Grad der Myokardinsuffizienz abhängt, als in insuffizientem Gewebe ein Teil der β_2 -

AR von der AC entkoppelt und damit die β_2 -vermittelte Dilatation vermindert wird [78]. Die aktuelle Behandlungsleitlinie zur Therapie der systolischen linksventrikulären Dysfunktion sieht im medikamentösen Stufenschema eine Betablockergabe nach Herzinfarkt und bei Hypertonie ab dem Stadium NYHA I, ansonsten ab NYHA II vor [40]. Dies rechtfertigt eine erneute Untersuchung des katecholaminergen Effektes bei entsprechender Betablockervormedikation der Patienten. *Ferro et al.* [29] beobachteten unter A und NA an Koronararterien herzinsuffizienter Patienten eine Gefäßrelaxation. Vor dem Hintergrund der 16-stündigen Inkubation in $10 \mu\text{mol/L}$ Phenoxybenzamin und der Applikation von SNP zu Experimentbeginn ist zu hinterfragen, ob hier ein physiologischer Effekt abgebildet wurde.

Ferro et al. [29] zeigten bei niedrigen AdrenalinKonzentrationen, dass die Applikation eines selektiven β_2 -AR-Antagonisten eine stärkere Relaxationshemmung bewirkte als die Gabe eines selektiven β_1 -AR-Antagonisten. Bei AdrenalinKonzentrationen von mehr als $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$ kehrte sich der Effekt um. Das beschriebene Phänomen betont die Notwendigkeit, den Einfluss von Katecholaminen auf die Vasomotorik mittels Dosiswirkungskurve zu untersuchen. Bei chronischer Blockade von β_1 -AR konnte zudem eine Herunterregulation der β_2 -Rezeptorantwort festgestellt werden [29]. Nicht untersucht wurde, welchen Einfluss Katecholamine und deren Antagonisten in Kombination aufweisen. Eine mögliche intrinsische Wirkung der α - und β -AR-Antagonisten blieb unberücksichtigt [29].

Eine Propranololgabe von 10^{-5} mol/L eliminierte die vasodilatatorische Antwort von NA vollständig, Practolol (10^{-6} mol/L , selektiver β_1 -AR-Antagonist) hingegen bewirkte keine Änderung des Gefäßtonus [78]. Die β -AR-Subtypen 1 und 2 ergeben keinen signifikanten Unterschied in der β_2 -AR-vermittelten Vasorelaxation nach Inkubation mit selektiven Subtypantagonisten und NA [29]. Eine Präinkubation in $1 \mu\text{mol/L}$ NA führte jedoch zu einer 45 %igen Abschwächung der β_2 -adrenergen Vasorelaxation. Die α_1 -adrenerge Vasorelaxation blieb unverändert. Die Autoren schlossen daher auf einen *in vitro* induzierbaren Kreuzeffekt zwischen β_1 und β_2 -Adrenorezeptoren. Auch eine mögliche intrinsische AR-antagonistische Wirkung wurde erwogen [29]. Daher wurden in dieser Arbeit auch Kontrollversuche mit Blockern ohne Katecholamine durchgeführt, um eine mögliche intrinsische Wirkung der AR-Antagonisten zu erfassen.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Eine umfassende Beurteilung des koronaren Gefäßtonus erfordert eine zusammenhängende Betrachtung der elektrischen, mechanischen und biochemischen Eigenschaften der glatten Muskulatur

[57, 68]. Daher ist es wichtig zu messen, inwieweit Katecholamine und deren AR-Antagonisten eine simultane Änderung des Membranpotentials, der Wandspannung und der cAMP- und cGMP-Konzentration bewirken. In der vorliegenden Arbeit werden diese Zusammenhänge erstmals an mit Katecholaminen superfundierten Koronararterien des Menschen untersucht.

Die *in vitro* Untersuchung von koronararteriellen Segmenten aus Herztransplantationen soll ein besseres Verständnis der Pathophysiologie pharmakologisch modifizierter Koronararterien ermöglichen. Die Applikation unphysiologischer Referenzsubstanzen wurde vermieden und das Patientenkollektiv nach Alter und Vormedikation analysiert. Die selektive AR-antagonistische Wirkung wurde auf eine mögliche intrinsische Blockeraktivität hin untersucht. Während in der Literatur bisher partielle AR-Antagonisten verwendet wurden, wird in dieser Arbeit erstmals der isolierte Einfluss von A und NA auf den Gefäßtonus ohne weitere pharmakologische Manipulation gemessen. Dabei ist besonders ein von der Katecholamindosis abhängiger Effekt [22, 66, 78] von Interesse, der mit Dosiswirkungskurven beschrieben wird [29].

2 Methoden

Es wurden *in vitro* Messungen der Wandspannung und des transmembranalen elektrischen Potentials an koronararteriellen Gefäßen von explantierten Herzen des Menschen unter Superfusion mit A, NA, sowie α - und β -AR-Blockern durchgeführt. Im Anschluss wurde an denselben Präparaten die cAMP- und cGMP-Konzentration mittels ELISA bestimmt.

2.1 Ein- und Ausschlusskriterien der Studie

Die Koronararterien stammten aus explantierten Herzen von 19 Patienten mit unterschiedlichen kardialen Vorerkrankungen (Tabelle 1). Diese Patienten unterzogen sich im Deutschen Herzzentrum Berlin zwischen dem 29.5.2008 und dem 14.3.2011 einer Herztransplantation. Einbezogen wurden auch Herzen, deren Funktion therapeutisch durch die Unterstützungssysteme Implantable Cardioverter Defibrillator (ICD) und Left Ventricular Assist Device (LVAD) bzw. Biventricular Assist Device (BVAD) verbessert wurde. Patienten mit/ ohne kombinierte Lungen- oder Nierentransplantation sowie mit/ ohne koronarer Herzerkrankung wurden unabhängig von Alter, Geschlecht, Vormedikation und Nebendiagnosen in der Studie berücksichtigt.

2.2 Gewinnung des Untersuchungsmaterials

Vom Zeitpunkt der Explantation des Herzens bis zum Verbringen der präparierten Koronararterien in ein Gefäß mit gekühlter Krebslösung (2°C – 8°C) verging maximal eine Stunde. Um die Vitalität des Präparates zu erhalten, wurde das Herz während dieser Übergangszeit im OP in einem separaten

Gefäß in gekühlter isotoner NaCl-Lösung aufbewahrt. Die Präparation der einzelnen Koronararterienabschnitte erfolgte innerhalb von maximal 45 Minuten in einer separaten Nierenschale. Dabei wurden pro Herz drei bis vier Koronararterienteile dargestellt. Die Arterienabschnitte wiesen eine Länge von mindestens 30 mm und einen Durchmesser von 1 – 3 mm auf. Sie wurden vorsichtig von epikardial stumpf mit zwei sterilen Pinzetten freigelegt, ohne mechanischen Zug oder Druck auf die Arterien auszuüben und ohne das Gefäßendothel zu berühren. Um einen Eindruck vom koronaren Gefäßstatus des Patienten zu erhalten, wurde mindestens ein Arterienabschnitt der *A. coronaria sinistra* und *dextra* präpariert. Bevorzugt gewählt wurden - aufgrund ihrer leichten Zugänglichkeit - der *R. marginalis dexter* sowie *R. interventricularis posterior* der *A. coronaria dextra* und der *R. interventricularis anterior* sowie *R. circumflexus* der *A. coronaria sinistra*. Stark rigide Gefäße, die makroskopisch sichtbare plaqueförmige Ablagerungen enthielten, sowie mit Stents versorgte Arterienabschnitte wurden nicht ausgewählt. Zu Anbindungsstellen von Bypassgefäßen blieb eine Distanz von mindestens 5 mm. Sämtliche Auffälligkeiten während der Präparation wurden protokolliert. Nach der Präparation wurden die Gefäßstreifen in einem verschlossenen Thermobehälter in modifizierter Krebslösung lichtgeschützt und bei 2°C – 8°C für 12 bis maximal 24 Stunden gelagert. Es folgte der ca. 45-minütige Transport ins Labor. Von der Explantation des Herzens bis zur laborexperimentellen Untersuchung der Koronarpäparate vergingen insgesamt maximal 36 Stunden.

2.3 Aufbau der Versuchsanlage

Die verwendete Apparatur dient der Messung der Wandspannung eines ca. 5 mm langen Koronarsegmentes mittels Kraftaufnehmer. Das Präparat wurde in einer mit sechs unterschiedlichen Lösungen aus sechs verschiedenen Zulaufsystemen durchströmbareren Kammer zwischen zwei Plexiglasbacken eingespannt. Die Fixierung des Präparates erfolgte mit zwei Schraubklemmen. Die Strömungsgeschwindigkeit der Lösung wurde mit Hilfe eines mechanischen Reglers bei 3 mL/min konstant gehalten. Ein mechanisches Umschaltssystem garantierte die Perfusion der Kammer aus dem gewünschten Zulauf des Wärmetauscherkreislaufes.

Die Lösungen für die sechs Zulaufsysteme wurden mit einem Carbogen-Gemisch begast (pH 7,36 – 7,43). Die Temperatur der Lösungen wurde mit einem Haake-Thermostaten auf 37,0°C konstant gehalten. Nach *Sun et al.* [78] beeinflussen unterschiedliche Ausgangsgefäßdurchmesser der eingespannten Präparate das prozentuale Dilatationspotential nicht.

Während eine Seite des Präparates über die Schraubklemme fix mit der Messkammer verbunden war, wurde die andere mit dem Kern eines induktiven Kraftaufnehmers gekoppelt. Die Messung

kann als nahezu isometrisch angenommen werden, da der Messweg des Kraftaufnehmers bei einer maximal möglichen Verkürzung des Präparats um etwa 1 % weniger als 100 μm beträgt. Die Kraftentwicklung wurde über einen digitalen Messverstärker (KWS 522.C; CMS 32, KS2C, Hottinger Baldwin, Darmstadt) angezeigt und via Datenschnittstelle RS 232C ausgegeben [70, 73]. Zusätzlich wurden in fünfminütigen Intervallen die Messwerte abgelesen. Die Vorrichtung zur Kraftmessung wurde von Zeit zu Zeit mit Gewichten von 1 g bis 10 g über eine Umlenkrolle kalibriert.

2.4 Aufbereitung der Koronarpräparate und Lösungen

Als Spül- und Badlösung diente modifizierte Krebslösung folgender Zusammensetzung:

Na^+ 151,19; K^+ 4,69; Ca^{2+} 2,52; Mg^{2+} 1,10; Cl^- 143,42; HCO_3^- 16,31; H_2PO_4^- 1,38 und Glucose 7,77 mmol/L. Aufgrund der ständigen Begasung mit einem Carbogen-Gemisch (95 % O_2 , 5 % CO_2) konnte auf einen Zusatz organischer Puffer verzichtet werden. Die Effektivität der Begasung wurde durch eine kontinuierliche Kontrolle des pH-Wertes gewährleistet.

Unter Beachtung der Herstellervorschriften wurden Konzentrationsreihen von Adrenalin und Noradrenalin (Arterenol[®]) mit 0,1 %iger Katecholaminkonzentration in isotonischer Lösung (Sanofi-Aventis, Berlin) erstellt. Als nicht selektiver α -AR-Antagonist fand Phentolaminhydrochlorid (10^{-7} mol/L), als unselektiver β -AR-Antagonist Propranololhydrochlorid (10^{-7} mol/L) Verwendung.

Vor Beginn des Versuches wurden die Koronarpräparate in carbogenisierter Krebslösung (37°C) äquilibriert, wodurch die ursprünglichen Ionenkonzentrationen wiederhergestellt wurden. Es fand nun eine makroskopische Beurteilung des Arteriosklerosegrades der Gefäße statt. Zehn Minuten vor Versuchsbeginn wurde ein Koronararteriensegment mit einer Länge von ca. 5 mm vollständig von lose anhaftendem Bindegewebe befreit und längs aufgeschnitten. Das entstandene ca. 5 mm x 10 mm große Gefäßstück wurde an den Schnittenden mit der Endothelfläche nach oben in den Kraftaufnehmer eingespannt.

Aus einer Dilatation des Gefäßes resultierte eine positive Längenänderung, die zu einer verminderten Kraftwirkung an den Aufnehmern führte. Das Präparat wurde während des Einspannens ausschließlich an hinterher unter dem Kraftaufnehmer befindlichen Stellen berührt. Dadurch blieb das Endothel weitgehend intakt. Um einen einheitlichen Anfangswert des Gefäßtonus zu erreichen, wurde das Präparat innerhalb von zehn Minuten auf 2 g vorgespannt, was nach der Laplace-Gleichung einem arteriellen Mitteldruck von 100 mmHg entspricht [83]. Pro Minute wurde durch vorsichtiges Auseinanderbewegen der Backen mittels Feintrieb ein Tonusanstieg von 400 mg

bewirkt. Nachdem der Ausgangstonus von 2 g nach 5 Minuten erreicht war, wurde diese Spannung durch vorsichtige Nachregulation am Feintrieb für weitere 5 Minuten aufrecht erhalten. Danach erfolgte die erste Messung.

2.5 Ermittlung der mechanischen Spannung

2.5.1 Versuchsablauf

Bei den Versuchen wurden Koronarien von 19 Patienten untersucht. Für jeden Einzelversuch wurde ein neuer Koronarabschnitt verwendet. Die an einem Versuchstag durchgeführten Experimente wurden in ihrer Abfolge variiert, um durch die experimentelle Anordnung eventuell verursachte systematische Fehler auszugleichen. Ein Experiment der Messreihe 1 bis 3 bestand aus 6 Messkomplexen.

Beginnend mit einer 15-minütigen Superfusion des Präparates mit Krebslösung wurde die Substratkonzentration A bzw. NA von 10^{-8} mol/L alle 15 min um eine Zehnerpotenz bis auf 10^{-3} mol/L gesteigert. Nach Registrierung des letzten Messwertes wurde das Präparat vorsichtig ausgespannt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die 3 Messreihen beinhalteten folgende Untersuchungen:

Messreihe 1: Untersuchung des Einflusses von A und NA bei konstanter Strömungsgeschwindigkeit von 3 mL/min ($n = 6$) auf den Gefäßtonus von Koronarmaterial von sechs Patienten. Als Kontrolle diente erweiterte Krebslösung.

Messreihe 2: Untersuchung des Einflusses von kombinierter α - und β -AR-Blockade (10^{-7} mol/L) in Anwesenheit von A oder NA ($n = 8$). Als Kontrolle diente Krebslösung mit α - und β -AR-Antagonisten.

Messreihe 3: Untersuchung des Einflusses von α - oder β -AR-Blockade (10^{-7} mol/L) in Anwesenheit von A oder NA ($n = 5$). Als Kontrolle wurde Krebslösung mit α - oder β -Rezeptorblocker verwendet.

2.5.2 Korrektur der Stress-Relaxation

Da alle Präparate über die Zeit eine individuelle von der Flussrate unabhängige Stress-Relaxation zeigten, wurde die auf das Pharmakon zurückzuführende Tonusänderung nach folgendem Schema ermittelt: Nachdem Pharmakonkurve und Kontrollkurve auf den gleichen Ausgangstonus nach 15-minütiger Äquilibration in Krebslösung normiert waren, wurde zu jedem Messpunkt der Wert der Kontrollkurve von dem Messwert der Pharmakonkurve subtrahiert. Diese Differenz gibt die Nettowirkung des Pharmakons unabhängig von der Stressrelaxation an. Es folgte die Mittelwertbildung des Tonus aller Präparate nach 15-minütiger Superfusion mit Krebslösung. Ausgehend von diesem

mittleren Tonus wurden die Differenzen für jeden Messpunkt addiert. Es entstand eine Dosiswirkungskurve, die die Nettowirkung jedes Pharmakons unabhängig von der Stressrelaxation aufzeigt.

2.5.3 Bestimmung der intrinsischen Blockeraktivität

Wies die Relaxation des Präparates unter Krebslösung einen anderen Kurvenverlauf auf als unter Krebslösung mit AR-Blockade, wurde eine intrinsische Aktivität des AR-Blockers vermutet. Die intrinsische Blockeraktivität wurde bei der Beurteilung der Nettowirkung der AR-Antagonisten unter Katecholaminen berücksichtigt. Sie ist zusammen mit den übrigen Messergebnissen in Tabelle 2 ausgewiesen.

2.6 Intrazelluläre Membranpotentialableitung

2.6.1 Versuchsaufbau, Mikroelektroden und Datenaufnahme

Die intrazelluläre Membranpotentialmessung wurde mittels Mikroelektroden, die mit 3 mol/L KCl gefüllt waren, vorgenommen. Es wurden aus Spezialglas (Pyrex Brand K2916 Corning Glass Works, New York; Innen-/Außendurchmesser 1,8/3,0 mm) mit einem Horizontalpuller (T. Chowdhury Pipette Puller, ISEW, Kalkutta) bei 6,8 A Heizstrom in 2 min ausgezogene Elektroden verwendet. Alle Mikroelektroden wiesen einen Spitzendurchmesser $< 1 \mu\text{m}$ und einen Widerstand zwischen 60 und 100 M Ω auf. Das Tip-Potential der Mikroelektroden betrug 60 – 100 mV. Die gemessene Potentialdifferenz wurde 10-fach verstärkt auf einem Großbildoszilloskop (SGM 43 BN901 c/N293, Knott, München) dargestellt, zur Dokumentation mit Hilfe eines Analog/Digital-Digital/Analog-Wandlers (DT 2812, Data Translation, Marlboro, Massachusetts, USA) digitalisiert und in Echtzeit in WinADDA (V.1.31, Mikrotaurus, Software, Berlin) am PC ausgewertet.

2.6.2 Intrazelluläre Platzierung der Elektroden

Der Einstichvorgang fand unter Kontrolle am Großbildoszilloskop statt, das ein Eindringen der Elektrode in den Intrazellulärraum der glatten Muskelzelle als plötzlichen steilen Potentialabfall auf -40 bis -65 mV anzeigte. Positiver liegende Potentialabfälle wurden als vom Endothel stammend beurteilt und verworfen. Vor dem Einstich wurde die Messelektrode mittels eines Mikromanipulators senkrecht an die luminale Seite des Gefäßstreifens herangeführt. Am Ende jeder Messung wurden Tip-Potential und Elektrodenwiderstand überprüft. Nur wenn beide Parameter gegenüber ihrem Ausgangswert vor dem Einstich unverändert waren, wurde das gemessene Potential in die Auswertung einbezogen.

2.6.3 Konzentrationsbestimmung von cAMP und cGMP

Die Konzentrationsbestimmung der zyklischen Nukleotide erfolgte aus den gleichen Koronarpräparaten, an denen vorher Tonus und Potential gemessen wurden. Da die Gefäßsegmente sofort nach Versuchsende in flüssigem Stickstoff (-196 °C) tiefgefroren wurden, konnten die cAMP- und cGMP-Konzentrationen für längere Zeiten konserviert werden. Die Konzentration der zyklischen Nukleotide wurde nach Aufschluss des Gewebes mittels ELISA bestimmt.

Aufschluss des Gewebes

Das Gewebe wurde gewogen und aus flüssigem Stickstoff in einen gekühlten Glasmörser überführt. Es erfolgte die Zugabe von 200 µl Lyselösung (0,25 %ige Dodecyltrimethylammoniumbromid-Lösung), an die sich das Homogenisieren des Gewebes anschloss. Der Homogenisierungsvorgang dient der Zerstörung von Membranen, Epithel und Muskelgewebe. Der Überstand wurde in einen 1,5 ml R-Tube überführt. Im Nachspülvorgang wurden weitere 200 µl Lyselösung appliziert und der Überstand ebenfalls in den R-Tube überführt [80, 81].

Bestimmung der cAMP-Konzentration mittels ELISA

Die cAMP-Konzentration wurde mit den Biotrak-ELISA-Reagenzien (Amersham Pharmacia Biotech) ohne Acetylierung bestimmt. Der Biotrak ELISA beruht auf der Konkurrenz der Bindung des freien cAMP der Probe mit einem cAMP-Peroxidase-Konjugat um immobilisiertes cAMP-spezifisches Antiserum [80, 81]. Vor der Verwendung wurde das Antiserum 1 : 2 mit dem Testpuffer verdünnt. Anschließend wurden Antiserum und cAMP-Peroxidase-Konjugat in jeweils 11 mL Testpuffer gelöst. Mit Hilfe einer Stammlösung (32 nmol/L) wurde eine Verdünnungsreihe des Standards hergestellt, die 0; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400; 800; 1600 und 3200 fmol in jeweils 100 µL Volumen enthielt. Die Ansätze enthielten entweder 100 µL Standard oder 80 µL Testpuffer sowie 20 µL Probe und wurden auf einer mit Anti-Kaninchen-IgG beschichteten 96-well ELISA-Platte hergestellt. Hohe cAMP-Konzentrationen in der Probe hatten eine entsprechende Reduktion der Probenmenge zur Folge. 200 µL Testpuffer zur Bestimmung der unspezifischen Bindung des Konjugats „NSB“ wurden 120 min im Kühlraum bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Die Duplikate der Standards und Proben wurden vor der Inkubation zusätzlich mit 100 µL Antiserum versetzt. Nach Ende der Inkubationszeit wurde zu allen Ansätzen 50 µL cAMP-Peroxidase-Konjugat hinzugegeben, woran sich nochmals 60 min Inkubation anschloss. Danach wurden die Ansätze 5-mal mit Waschpuffer (Testpuffer plus 0,05 % Tween 20) gewaschen und sorgfältig getrocknet [80, 81].

Die quantitative Bestimmung des gebundenen Peroxidase-Konjugats erfolgte photometrisch über die Umsetzung von 3,3', 5,5'- Tetramethylbenzidin (TMB) in Peroxidase. Während in alle Wells 150 µL der fertigen TMB-Substratlösung gegeben wurde, konnte bei Raumtemperatur die Blaufärbung des Standards beobachtet werden. Die Reaktionszeit wurde, abweichend von den Angaben des Herstellers so gewählt, dass ein Wert von 1,5 bis 1,7 Absorptionseinheiten nicht überschritten wurde. Der dafür benötigte Zeitraum variierte zwischen 10 und 120 Minuten. Sobald die optimale Blaufärbung der Nullwerte erreicht wurde, konnte 100 µL 1 mol/L Schwefelsäure zugegeben werden, was einen Farbumschlag nach Gelb zur Folge hatte. Dieser blieb bis zu einer Stunde lang stabil. Die anschließende Absorptionsmessung wurde mit einem ELISA Reader bzw. einem Perkin Elmer Victor ELISA Platten Photometer bei 450 nm durchgeführt.

Bestimmung der cGMP-Konzentration mittels ELISA

cGMP wurde mittels einer analogen Methode bestimmt. Hier fand jedoch eine Acetylierung von Standards und Samples statt. Die Sensitivität des Tests konnte etwa um den Faktor 10 gesteigert werden, da das Antiserum zu acetylierten Zyklonukleotiden eine höhere Affinität besitzt. Das Acetylierungsreagenz enthielt zu zwei Teilen Triäthylamin und zu einem Teil Essigsäureanhydrid. Die Proben und Standards wurden zu jeweils 1/10 ihres Volumens mit dem Acetylierungsreagenz versetzt. Innerhalb von etwa fünf Minuten war die Acetylierungsreaktion abgeschlossen. Die Standards enthielten 0; 2; 4; 8; 16; 32; 64; 128; 256 und 512 fmol pro Ansatz in einem Volumen von 50 µL. Für die Acetylierung der Proben wurden 100 µL Probe mit 10 µL Testpuffer und 11 µL Acetylierungsreagenz versetzt. Der NSB-Ansatz enthielt 150 µL Testpuffer. Es wurden für den Messansatz 100 µL Antiserum vorgelegt, zu dem jeweils 50 µL Standard oder Probe gegeben wurde [80, 81]. Alle Ansätze wurden zweifach hergestellt und 120 Minuten inkubiert. Auf die Zugabe von 100 µL cGMP-Peroxidase-Konjugat folgten erneut 60 Minuten Inkubation. Anschließend wurden die Ansätze gewaschen, mit 200 µL TMB-H₂O₂-Reagenz versetzt und, wie bereits erläutert, für einen variablen Zeitraum bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 100 µL 1 mol/L Schwefelsäure erfolgte die photometrische Bestimmung der Absorption.

Auswertung mittels Kalibrierungskurve

Eine nicht lineare Kalibrierungskurve mit cAMP-Mengen zwischen 0 und 3200 fmol/L Ansatz wurde mit einem least square fit angepasst. In der verwendeten Funktionsgleichung $y = ((a \cdot b)/(b + x)) + c$ steht x für die Konzentration des Standards. Aus den Fitparametern a, b und c wurde die Menge (x) cAMP der Proben (in fmol) über $x = ((a \cdot b)/(y - c)) - b$ berechnet. Die Variable y steht dabei für die Absorption bei 450 nm. Die Konzentration ergab sich anschließend

aus dem Produkt von x und Faktor f (Gesamtvolumen/ eingesetztes Probenvolumen) dividiert durch das Gewebsgewicht in mg. Die so ermittelte Konzentration trägt die Einheit nmol/kg.

2.7 Statistische Methoden

Alle Messwerte wurden als Mittelwerte \pm SEM voneinander unabhängiger Experimente (n) angegeben, da sie mit Hilfe des Kolmogorow-Smirnow-Tests als normalverteilt beurteilt wurden. Eine Überprüfung der statistischen Signifikanz konnte daher mittels zweiseitigem t-Test nach Student für unverbundene Zufallsstichproben aus normalverteilten Grundgesamtheiten stattfinden (SPSS Statistics 19). Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ festgelegt. Die Korrelation einzelner Parameter wurde anhand des Pearsonschen Korrelationskoeffizienten definiert.

3 Ergebnisse

3.1 Eigenschaften der untersuchten Präparate

Bei den untersuchten Koronararterien aus 19 Patientenherzen lagen unterschiedliche Transplantationsgründe und Prämedikationen vor, die den Koronartonus, das Potential und die Konzentration der zyklischen Nukleotide möglicher Weise beeinflusst haben. Tabelle 1 gibt einen Überblick der Charakteristika der Studienpopulation.

Tabelle 1: Charakteristika der Studienpopulation (Mehrfachnennungen möglich)

Charakteristika der Studienpopulation (n = 19)	Fallzahl
Patientenalter [a]	1 – 59
Meridian des Patientenalters [a]	41
Geschlecht	
• weiblich	4
• männlich	15
Patienten mit makroskopisch arteriosklerotischen Koronararterien	3
Diagnostizierte kardiologische Vorerkrankungen	
• dilatative Kardiomyopathie	12
• restriktive Kardiomyopathie	2
• Myositis	6
• kongenitale Defekte	4
• Koronare Herzerkrankung	3
Vormedikation	
• Katecholamine	6
• β -Blocker (gesamt)	15
–Carvedilol	7
–Sotalolol	1
• Phosphodiesterasehemmer	3

3.2 Kraft- und Potentialentwicklung

3.2.1 Verhalten in Krebslösung

Bei konstantem Fluss von 3 mL/min konnte nach dem Vorspannen des Präparates auf 2 g und 15-minütiger Inkubation in Krebslösung an den untersuchten Koronararterien der 19 Patienten im Mittel eine Tonusabnahme um $0,296 \pm 0,036$ g über die Zeit festgestellt werden (Stressrelaxation).

Einfluss des Patientenalters

Patienten mit koronarer Vorbelastung (Therapie mit Katecholaminen, nicht-selektiven β -AR-Antagonisten), diagnostizierter KHK oder makroskopisch arteriosklerotischen Gefäßen wurden gesondert analysiert ($n = 5$). Hier fanden wir eine mit dem Alter abnehmende Stressrelaxation der Koronargefäße in Krebslösung. Berücksichtigt man sämtliche Patienten der jeweiligen Altersgruppe, so ergab sich mit zunehmendem Alter ebenfalls eine geringere Tonusabnahme. Während bei den Patienten in der Altersgruppe 30 - 39 Jahre an 13 Präparaten ein Tonus von $1,423 \pm 0,113$ g registriert wurde, betrug dieser in der Gruppe der 40 - 49-Jährigen bei 23 Präparaten $1,732 \pm 0,048$ g ($p < 0,03$; gegenüber der Altersgruppe 30 - 39 Jahre). Die über 50-jährigen Patienten wiesen mit $1,760 \pm 0,036$ g an 27 Präparaten einen ebenfalls signifikant höheren Koronartonus auf ($p < 0,02$; gegenüber der Altersgruppe 30 - 39 Jahre).

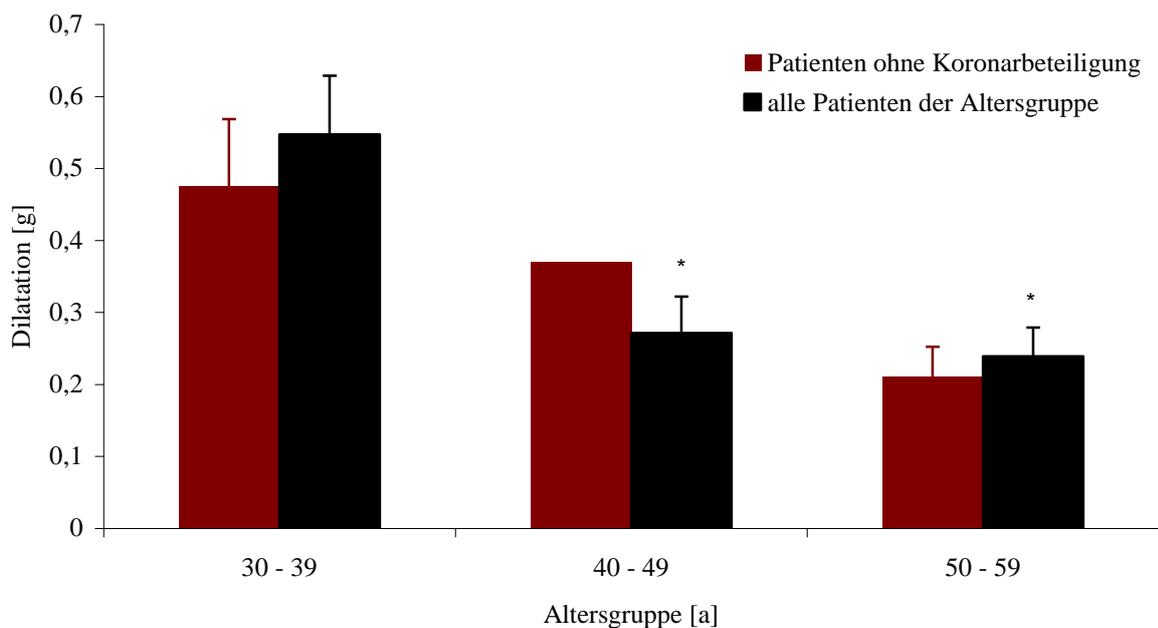


Abbildung 1:

Darstellung der Stressrelaxation in drei Altersgruppen (MW \pm SEM). Kriterien der Kategorie Patienten ohne Koronareteiligung: Keine β -Blockertherapie oder Katecholamingabe, keine KHK oder arteriosklerotische Gefäße, $n_{30-39} = 2$, $n_{40-49} = 1$, $n_{50-59} = 2$; Kategorie alle Patienten: $n_{30-39} = 3$, $n_{40-49} = 5$, $n_{50-59} = 6$; * $p < 0,05$ (im Vergleich zur Altersgruppe 30-39).

Beeinflussung durch arteriosklerotische Plaques

Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied im Basaltonus zwischen arteriosklerotischen Gefäßen und plaquefreien Koronararterien festgestellt werden. Die Wandspannung plaquefreier

Gefäße betrug $1,741 \pm 0,027$ (73 Präparate von 16 Patienten), die arteriosklerotischer Gefäße $1,669 \pm 0,096$ g (6 Präparate von 3 Patienten).

Beeinflussung durch die Prämedikation der Patienten

Die Prämedikation ergab keine statistisch signifikanten Änderungen. Der Koronartonus der 4 nicht mit β -AR-Antagonisten therapierten Patienten lag mit $1,753 \pm 0,051$ g (15 Präparate) geringfügig über dem der mit β -Blockern behandelten Referenzgruppe ($1,701 \pm 0,034$ g, 69 Präparate von 15 Patienten). Ein Vergleich zwischen Patienten, behandelt mit den nicht β_1 -selektiven Antagonisten Carvedilol und Sotalolol ($1,737 \pm 0,034$ g, 35 Präparate von 8 Patienten) und den selektiven β -Blockern ($1,665 \pm 0,058$ g, 34 Präparaten von 7 Patienten) ergab eine geringfügigere Tonusminderung bei Prämedikation mit β_1 -selektiven Antagonisten ($p = 0,30$).

An 29 Präparaten der 6 mit Katecholaminen prämedizierten Patienten (täglich über mindestens eine Woche 250 mg Dobutamin oder Dopamin) wurde ein Tonus von $1,732 \pm 0,623$ g gemessen. Der Unterschied zur Gruppe ohne katecholaminerge Medikation mit $1,699 \pm 0,312$ g (55 Präparate) war nicht signifikant ($p = 0,59$). Drei Patienten hatten vor der Herztransplantation Phosphodiesterasehemmer erhalten. Der Koronartonus dieser Gruppe (15 Präparate) lag mit $1,786 \pm 0,055$ g höher als der Tonus der Vergleichsgruppe (69 Präparate) mit $1,694 \pm 0,024$ g ($p = 0,238$).

Kontrollversuche in Krebslösung

Der Einfluss der unterschiedlichen Charakteristika und Prämedikationen der Studienpopulation lässt den Bezug jedes Einzelversuches auf eine Kontrollmessung in Krebslösung als notwendig erscheinen. Der entsprechende Normierungsmodus wird im Kapitel 2.5.2 „Korrektur der Stressrelaxation“ erläutert. In den Kontrollversuchen, bei denen ausschließlich Krebslösung für einen Zeitraum von 120 min appliziert wurde, zeigte sich eine signifikante flussunabhängige Tonusabnahme (Fluss = 3 mL/min) der Gefäße über die Zeit (Stressrelaxation) von $1,770 \pm 0,059$ g auf $1,488 \pm 0,097$ g ($n = 6$; $p < 0,05$). Dies entspricht einer prozentualen Relaxation von 15,9 %.

3.2.2 Katecholamine

Adrenalin superfundierte Präparate zeigten gegenüber der Kontrollmessung im Konzentrationsbereich 10^{-8} bis 10^{-3} mol/L eine Tonusminderung von insgesamt 0,224 g ($p < 0,05$; gegenüber dem Ausgangswert in Krebslösung). Bei jeder Konzentrationsstufe ergab sich gegenüber Krebslösung eine adrenalinbedingte Relaxation. Bei 10^{-3} mol/L betrug die Wandspannung nur noch $1,546 \pm 0,174$ g. Die Tonusdifferenz zwischen den Messpunkten 10^{-3} und 10^{-4} mol/L war bei A signifikant größer als unter Krebslösung ($p < 0,015$). Der auf A zurückzuführende dilatative Effekt belief sich nach 105 min Versuchszeit auf 12,7 %.

Unter NA zeigte sich im Konzentrationsbereich 10^{-6} bis 10^{-5} mol/L eine Kontraktion, die ihr Maximum mit $1,822 \pm 0,198$ g bei 10^{-5} mol/L erreichte. In den Bereichen 10^{-8} bis 10^{-7} mol/L fanden sich geringfügige Dilatationen von 0,018 g und 0,012 g im Vergleich zur Krebslösung. Wurde die NA-Konzentration auf 10^{-3} mol/L erhöht, so dilatierten die Koronararterien auf $1,613 \pm 0,175$ g ($p > 0,05$, gegenüber dem Ausgangswert in Krebslösung), was einem auf NA zurückzuführenden relaxierenden Effekt von 8,9 % entsprach. Auch bei NA war die Tonusdifferenz zwischen den Messpunkten 10^{-3} und 10^{-4} mol/L mit $p < 0,05$ bei NA signifikant größer als unter Krebslösung.

Tabelle 2 zeigt eine Übersicht der für Krebslösung sowie A und NA ohne/ mit α - und β -AR-Antagonisten ermittelten Tonuswerte. Der Nettoeffekt aller katecholaminhaltigen Ansätze wird ohne die Stressrelaxation im zweiten Teil der Tabelle angegeben. Die Krebslösung enthaltenden Kontrollkurven zeigen die Stressrelaxation und die intrinsische Antagonistenaktivität im ersten Teil der Tabelle. Die Erläuterung des Normierungsverfahrens findet sich im Kapitel 2.5.2 „Korrektur der Stressrelaxation“.

Tabelle 2: Wandspannung bei Katecholaminen

im Konzentrationsbereich von 10^{-8} bis 10^{-3} mol/L ohne/ mit α - bzw. β -AR-Antagonisten, ($n_{\text{Krebs}} = 6$, $n_{\text{A}} = 12$, $n_{\text{NA}} = 11$, $n_{\text{Katecholamin} + \text{AR-Ant}} = 5$, $n_{\text{Katecholamin} + \text{beide AR-Ant}} = 8$). Bei allen katecholaminhaltigen Lösungen ist der Nettoeffekt des Pharmakons ohne die Stressrelaxation angegeben. Die Krebslösung enthaltenden Kontrollmessungen (Zeile 1 - 4) zeigen die Stressrelaxation (Zeile 1) sowie die Stressrelaxation + die intrinsische Blockeraktivität (Zeile 2 – 4).

c [mol/L]	Krebs	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}
T_{Krebs}[g]	1,770 ± 0,021	1,687 ± 0,073	1,637 ± 0,077	1,600 ± 0,081	1,564 ± 0,085	1,523 ± 0,091	1,488 ± 0,097
T_{Krebs + α-Ant} [g]	1,770 ± 0,022	1,572 ± 0,142	1,351 ± 0,175	1,273 ± 0,191	1,178 ± 0,186	1,061 ± 0,174	0,967 ± 0,171
T_{Krebs + β-Ant} [g]	1,770 ± 0,022	1,609 ± 0,096	1,450 ± 0,137	1,339 ± 0,157	1,221 ± 0,167	1,109 ± 0,176	1,021 ± 0,190
T_{Krebs + α-, β-Ant} [g]	1,770 ± 0,022	1,572 ± 0,079	1,467 ± 0,100	1,386 ± 0,104	1,319 ± 0,104	1,258 ± 0,102	1,170 ± 0,097
T_A [g]	1,770 ± 0,021	1,651 ± 0,096	1,614 ± 0,126	1,606 ± 0,152	1,652 ± 0,136	1,647 ± 0,151	1,546 ± 0,174
T_{A + α-Ant} [g]	1,770 ± 0,021	1,904 ± 0,051	1,915 ± 0,104	1,852 ± 0,189	1,810 ± 0,207	1,988 ± 0,287	1,719 ± 0,229
T_{A + β-Ant} [g]	1,770 ± 0,021	1,899 ± 0,157	2,121 ± 0,249	2,169 ± 0,288	2,328 ± 0,298	2,321 ± 0,347	2,142 ± 0,330
T_{A + α, β-Ant} [g]	1,770 ± 0,021	1,781 ± 0,139	1,926 ± 0,181	2,014 ± 0,278	2,466 ± 0,342	2,319 ± 0,272	1,791 ± 0,196
T_{NA} [g]	1,770 ± 0,021	1,752 ± 0,098	1,758 ± 0,133	1,802 ± 0,150	1,822 ± 0,198	1,762 ± 0,208	1,613 ± 0,175
T_{NA + α-Ant} [g]	1,770 ± 0,021	1,903 ± 0,121	2,142 ± 0,176	2,223 ± 0,219	2,148 ± 0,216	2,352 ± 0,186	2,246 ± 0,224
T_{NA + β-Ant} [g]	1,770 ± 0,021	1,872 ± 0,110	2,038 ± 0,146	2,169 ± 0,160	2,324 ± 0,176	2,325 ± 0,193	2,153 ± 0,261
T_{NA + α, β-Ant} [g]	1,770 ± 0,021	1,704 ± 0,136	1,711 ± 0,172	1,716 ± 0,174	1,764 ± 0,185	1,744 ± 0,198	1,690 ± 0,192

In einer grafischen Darstellung der Tonusänderungen unter A und NA imponiert eine ähnliche bisigmoidale Kinetik beider Kurven mit einem Tonusmaximum bei 10^{-5} mol/L und Minima bei 10^{-7} (NA) und 10^{-6} (A) sowie 10^{-3} mol/L (A und NA). Für A ergab sich bei der Membranpotentialmessung analog zur Relaxation im gesamten Konzentrationsbereich von 10^{-8} bis 10^{-3} mol/L eine Hyperpolarisation, mit einem Maximum bei 10^{-3} mol/L von $-51,2 \pm 0,1$ mV. Dies entspricht einem Spannungsabfall von 3,6 % im Vergleich zum Ausgangspotential von $-49,4 \pm 0,1$ mV in Krebslösung ($p < 0,01$). Ein Hyperpolarisationsminimum fand sich mit $-50,8 \pm 0,1$ mV bei 10^{-6} mol/L. Unter NA depolarisierten die glatten Muskelzellen im Bereich zwischen 10^{-8} und 10^{-4} mol/L mit einem Maximalwert von $-48,8 \pm 0,1$ mV bei 10^{-5} mol/L. Bei 10^{-3} mol/L hyperpolarisierte das Membranpotential auf $-50,7 \pm 0,1$ mV. Der Spannungsabfall gegenüber Krebslösung betrug 2,6 % ($p < 0,01$). Dieser Befund korreliert mit dem Tonusabfall bei gleicher NA-Konzentration. Der Unterschied zwischen den unter A gemessenen Potentialen und denen unter NA war mit $p < 0,01$ in jeder Konzentrationsstufe signifikant.

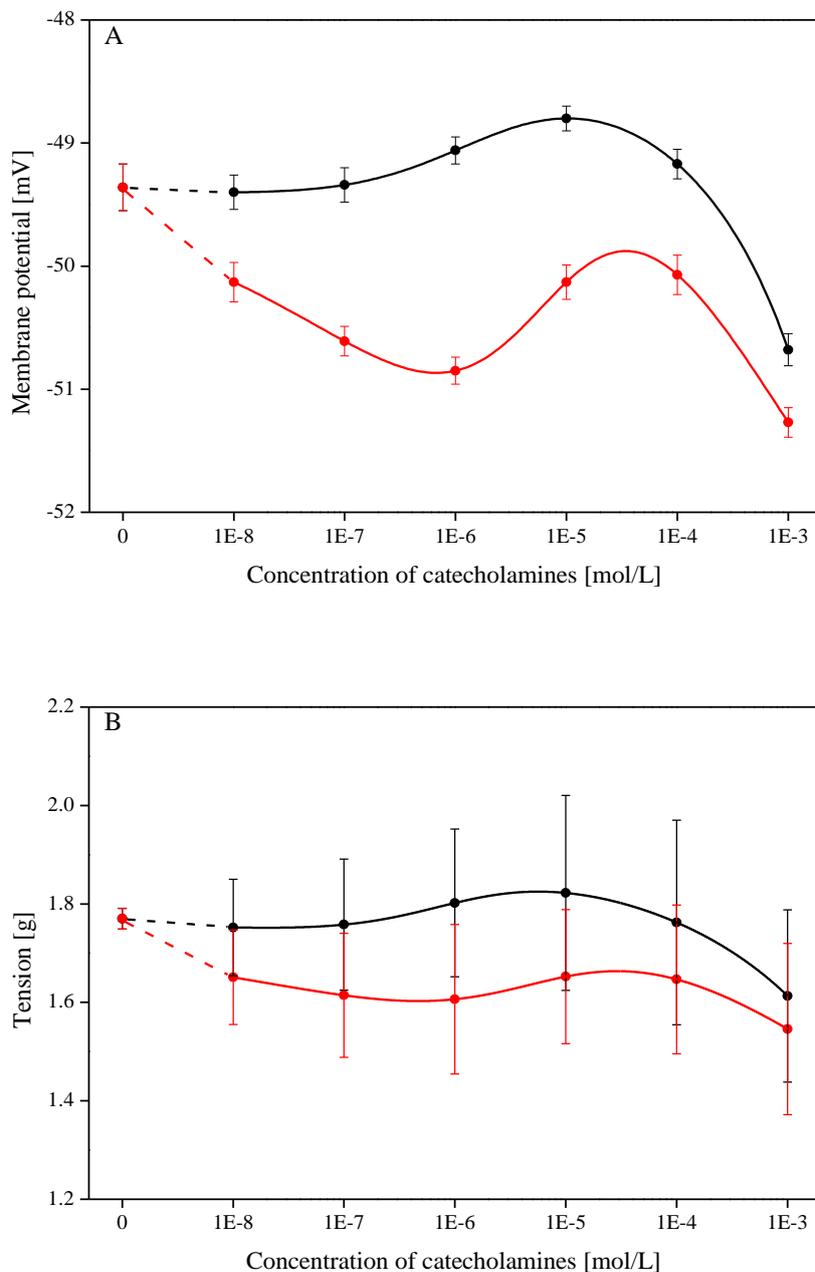


Abbildung 2:

Membranpotential (A) und Gefäßtonus (B) unter Adrenalin (●) und Noradrenalin (●) in Abhängigkeit von der Katecholaminkonzentration (MW \pm SEM, $n_A = 12$, $n_{NA} = 11$), $p < 0,01$ für Membranpotential (A): Adrenalin gegenüber Noradrenalin bei allen Messpunkten, $p > 0,05$ für Gefäßtonus (B): Adrenalin gegenüber Noradrenalin bei allen Messpunkten.

3.2.3 Wirkungsverteilung auf α - und β -AR

Aufschluss über die anteilige Wirkung beider Katecholamine auf α - und β -AR erlaubte die Berechnung der EC_{50} durch Anpassung der Messwerte an die Gleichung für bisigmoidale Kinetiken $T = a_1S^n / (1 + aS^n) - b_1S^m / (1 + bS^m)$ (Tabelle 3). Die Berechnung basiert auf der Annahme, dass postsynaptische α -AR hauptsächlich vasokonstriktorisch, postsynaptische β -AR vasodilatatorisch wirken. Für die β -AR wurde sowohl unter A als auch unter NA ein niedrigerer Erregungsschwellenwert ermittelt.

Tabelle 3: Aktivierungsschwellen- (S 0,005), EC_{10} -, EC_{50} -Werte und Tonusmaxima Adrenalin [A] und Noradrenalin [NA] an α - und β -AR [43]

	α -AR	β -AR
[A] $S(0,005)$ [mol/L]	$3,25 \cdot 10^{-9}$	$6,45 \cdot 10^{-16}$
[A] $S(0,1)$ [mol/L]	$2,68 \cdot 10^{-7}$	$5,73 \cdot 10^{-8}$
[A] $S(0,5)$ [mol/L]	$6,14 \cdot 10^{-6}$	$2,51 \cdot 10^{-2}$
[A] T_{max} [g]	0,379	-1,613
[NA] $S(0,005)$ [mol/L]	$4,49 \cdot 10^{-10}$	$2,91 \cdot 10^{-10}$
[NA] $S(0,1)$ [mol/L]	$4,70 \cdot 10^{-8}$	$8,09 \cdot 10^{-5}$
[NA] $S(0,5)$ [mol/L]	$1,28 \cdot 10^{-6}$	$5,91 \cdot 10^{-1}$
[NA] T_{max} [g]	0,253	-2,371

Die Berechnung des Tonus bei kombinierter A- und NA-Freisetzung ergab für den gesamten Konzentrationsbereich von 10^{-8} bis 10^{-3} mol/L eine Vasodilatation, die bei $1,42 \cdot 10^{-5}$ mol/L ein Minimum aufweist. Damit kann der koronare Vasotonus zusätzlich zur flussabhängigen Dilatation ($\Delta T = -0,253$ g) durch entsprechende Variation der Katecholaminkonzentration um weitere 25 – 150 % reduziert werden [43].

3.2.4 Intrinsische Aktivität der α - und β -Rezeptorantagonisten

Die Applikation von Propranololhydrochlorid (PR) (10^{-7} mol/L) und Phentolaminhydrochlorid (PH) (10^{-7} mol/L) ohne Gabe exogener Katecholamine bewirkte gegenüber Krebslösung eine Verstärkung der Stressrelaxation (Tabelle 2). Dieser Befund legt eine intrinsische Wirkung der Rezeptorantagonisten nahe. Dabei relaxierten die Gefäße nach 105 min unter PH am stärksten ($p = 0,129$ für den intrinsischen Blockereffekt), im Vergleich zu Krebslösung um weitere 35,0 %. Bei PR betrug der zusätzliche dilatative Effekt 31,4 % ($p = 0,18$ für den intrinsischen Blockereffekt). Beide AR-Antagonisten in Kombination ergaben einen Tonus von $1,170 \pm 0,097$ g ($p = 0,078$ für den intrinsischen Blockereffekt). Dies entspricht einer Steigerung des dilatativen Effektes um 21,4 %.

3.2.5 Allgemeine Beobachtungen bei der selektiven Adrenorezeptorblockade

Betrachtet man die unter Adrenorezeptorblockade gemessenen mechanischen Spannungen, so findet sich bei allen AR-Antagonisten eine Tonussteigerung (Tabelle 2). Diese Werte ermöglichen einen Vergleich mit der bei analogen Versuchsbedingungen durchgeführten elektrischen Potentialmessungen.

3.2.6 Gefäßtonus unter Phentolamin und Adrenalin

Sowohl Tonuserhöhung als auch Depolarisation des Membranpotentials lassen auf eine PH-vermittelte Vasokonstriktion schließen. Abhängig von der Adrenalinkonzentration zeigt sich ein bisigmoidaler Kurvenverlauf (Tabelle 2). Die Antagonisierung der α -AR hatte bei 10^{-3} mol/L A mit einem Tonus von $1,719 \pm 0,229$ g eine Kontraktionszunahme um $0,173$ g gegenüber Adrenalin zur Folge. Ein kontraktiles Maximum wurde unter 10^{-7} mol/L PH und 10^{-4} mol/L A mit einem Tonus von $1,988 \pm 0,287$ g erzielt, wodurch ein relativer Tonusanstieg von $20,7$ % gegenüber A erreicht werden konnte ($p = 0,058$). Die elektrischen Potentiale zeigen einen analogen Kurvenverlauf; Tonuszunahme ist mit Depolarisation, Tonusabnahme mit Hyperpolarisation korreliert. Die Applikation von PH bewirkte bei 10^{-3} mol/L A eine Depolarisation auf $-45,4 \pm 0,1$ mV, was im Vergleich zu Adrenalin mit $-51,2 \pm 0,2$ mV eine Depolarisation von $11,3$ % darstellt ($p < 0,001$). Das Tonusmaximum bei 10^{-4} mol/L entspricht einem Depolarisationsmaximum mit $-44,7 \pm 0,1$ mV ($p < 0,001$; gegenüber dem Ausgangswert in Krebslösung).

3.2.7 Gefäßtonus unter Propranolol und Adrenalin

Tonuserhöhung und Membrandepolarisation lassen Rückschlüsse auf eine Propranolol-vermittelte Vasokonstriktion zu. Tonus (Abbildung 3) und Membranpotential weisen ein Kontraktions- bzw. Depolarisations-Maximum bei 10^{-5} mol/L A auf. Das elektrische Potential ist hier mit $-44,7 \pm 0,2$ mV gegenüber A signifikant depolarisiert ($p < 0,001$), während der Tonus $2,328 \pm 0,298$ beträgt ($p = 0,172$; gegenüber A 10^{-5} mol/L). Zudem zeigt sich bei einer Adrenalinkonzentration von 10^{-3} mol/L im Vergleich zu Krebslösung ($-49,4 \pm 0,1$ mV) eine Depolarisation ($-46,6 \pm 0,1$ mV) um $5,6$ % ($p < 0,001$). Auch der Tonus nahm gegenüber Krebslösung um $21,0$ % zu. Verglichen mit dem Messpunkt nach 105 min Inkubation in Krebslösung ergab sich unter A + PR ein Tonusanstieg von $43,9$ %. Gegenüber A bewirkte A + PR eine Depolarisation um $9,0$ % ($p < 0,001$). Vergleicht man die Wandspannungen miteinander, so ergibt sich eine PR-bedingte Tonussteigerung von $38,6$ % ($p = 0,254$; gegenüber A 10^{-3} mol/L). Der unter A gezeigte vasodilatative Effekt wurde durch Propranolol in eine Vasokonstriktion umgekehrt. Für den A-Konzentrations-Bereich 10^{-8} bis 10^{-3} mol/L kann aufgrund des beobachteten vasokonstriktorischen Effektes eine ausreichende β -AR-Blockade durch Propranolol angenommen werden.

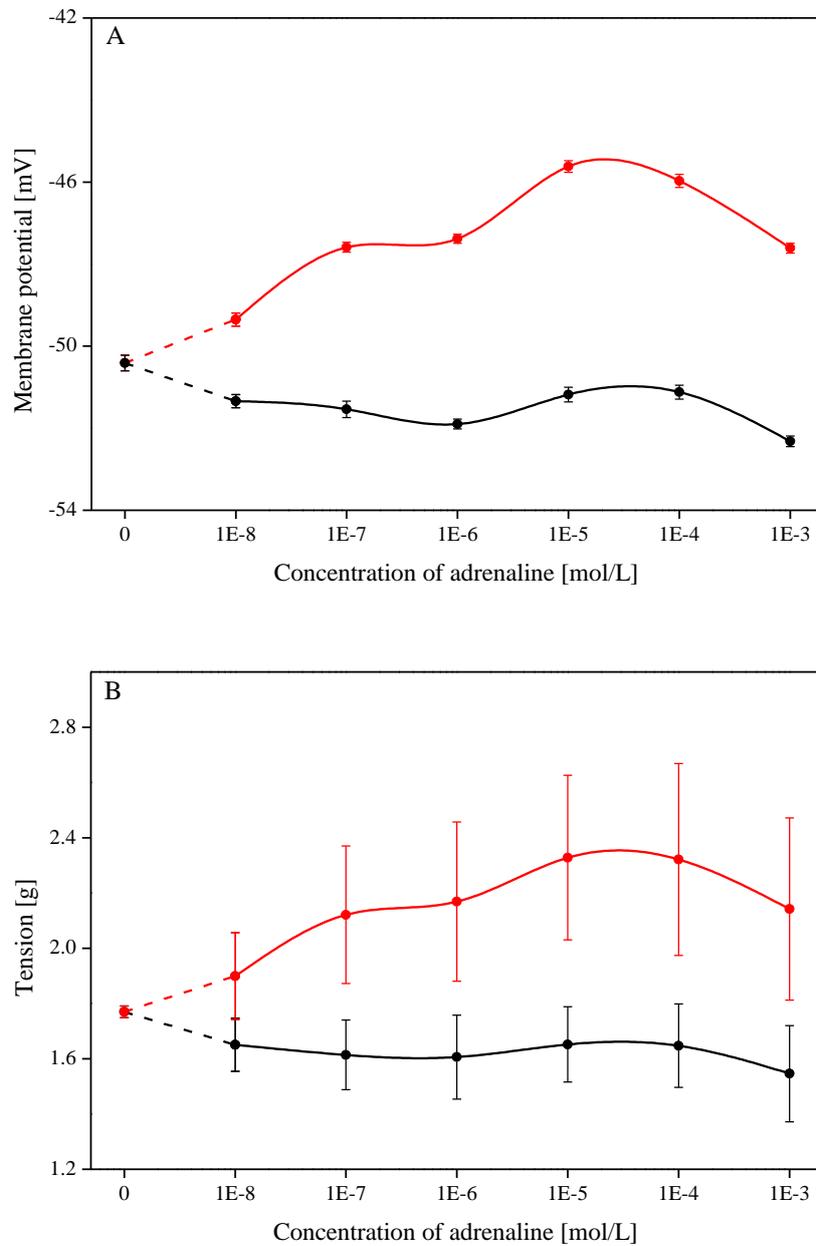


Abbildung 3:

Membranpotential (A) und Gefäßtonus (B) in Abhängigkeit von der Adrenalin­konzentration ohne (●) und mit Propranolol (●) (10⁻⁷ mol/L) (MW ± SEM; n_A = 12; n_{A + PR} = 5), p < 0,001 für Membranpotential (A): Adrenalin gegenüber Adrenalin + Propranolol bei allen Messpunkten, p > 0,05 für Gefäßtonus (B): Adrenalin gegenüber Adrenalin + Propranolol bei allen Messpunkten.

3.2.8 Gefäßtonus unter Phentolamin und Noradrenalin

Die Applikation von 10^{-7} mol/L PH zu NA hat einen mechanischen Tonusanstieg zur Folge. Dieser geht mit einer Depolarisation des Membranpotentials einher. Beides lässt auf eine kontraktile Wirkung von PH + A schließen. Die Messwerte für Tonus (Tabelle 2) und elektrisches Potential korrelieren. Bei 10^{-4} mol/L NA + 10^{-7} mol/L PH registrierten wir mit $2,352 \pm 0,186$ g ein Tonusmaximum ($p = 0,109$ im Vergleich zu NA 10^{-4} mol/L). Die entsprechende Depolarisation auf $-44,4 \pm 0,1$ mV war ebenfalls maximal ($p < 0,001$; NA 10^{-4} mol/L + PH gegenüber NA 10^{-4} mol/L). Ein Minimum, das den bisigmoidalen Kurvenverlauf charakterisiert, fand sich in Mechanik und Elektrik bei 10^{-5} mol/L NA. Der kontraktile Effekt bei 10^{-3} mol/L NA + PH gegenüber NA allein beträgt 39,2 % ($p = 0,062$) und ist zu einer Depolarisation bei NA + PH gegenüber NA 10^{-3} mol/L korreliert ($p < 0,001$).

3.2.9 Gefäßtonus unter Propranolol und Noradrenalin

Die für Tonus und Membranpotential ermittelten Werte zeigen einen analogen Kurvenverlauf, der eine durch Propranolol verursachte Vasokonstriktion bestätigt. So ergab die Potentialmessung für NA + PR eine Depolarisation (Abbildung 4). Die größte Depolarisation wurde mit $-43,4 \pm 0,2$ mV bei 10^{-4} mol/L NA ermittelt ($p < 0,005$). Auch das Tonusmaximum ergab sich mit $2,325 \pm 0,193$ g bei 10^{-4} mol/L NA. Das Membranpotential war bei 10^{-3} mol/L NA gegenüber Krebslösung depolarisiert (Reduktion um 6,3 %; $p < 0,01$); verglichen mit der NA-Kurve resultierte eine Depolarisation um 8,7 % ($p < 0,005$). Unter NA bewirkte PR einen Anstieg der mechanischen Spannung um 33,5 % ($p = 0,202$; NA 10^{-3} mol/L + PR gegenüber NA 10^{-3} mol/L). Im gesamten Bereich der untersuchten NoradrenalinKonzentrationen führte die β -AR-Blockade durch Propranolol zur Vasokonstriktion.

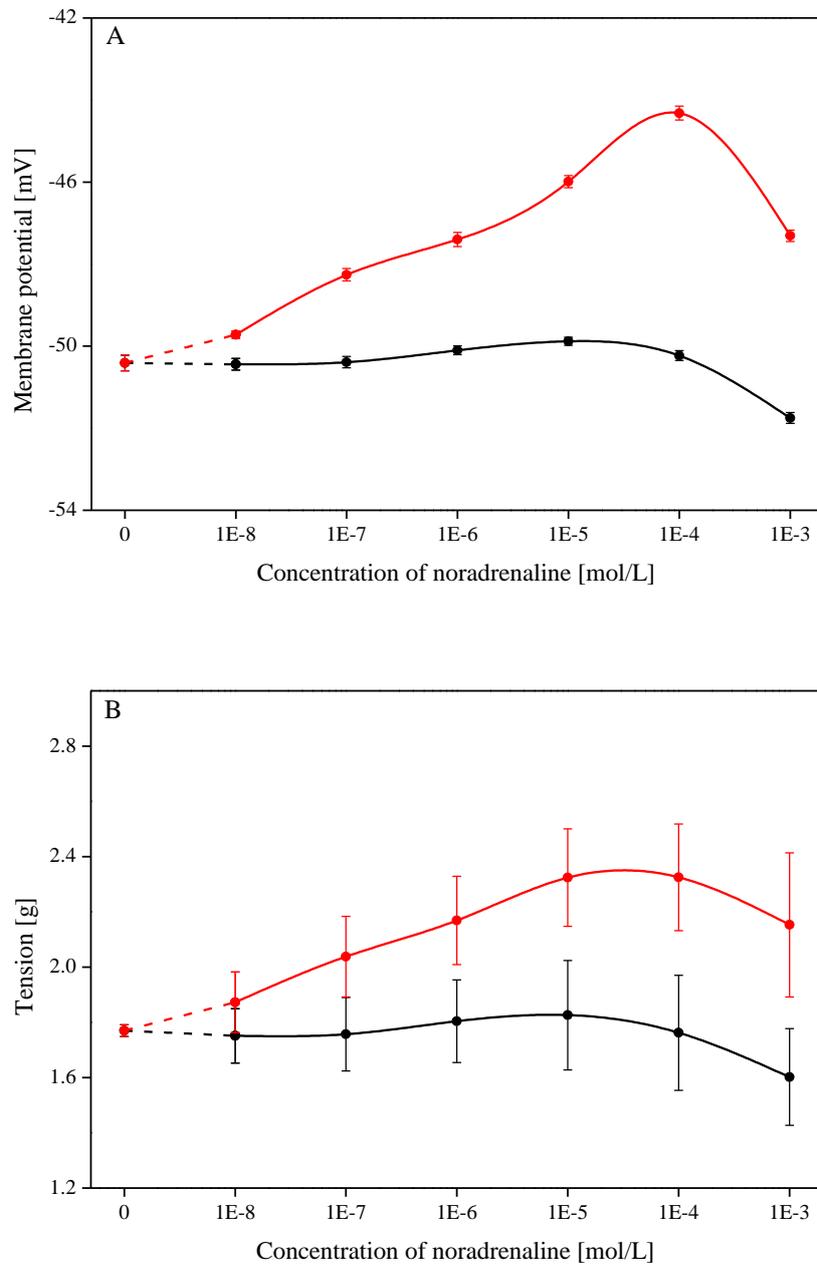


Abbildung 4:

Membranpotential (A) und Gefäßtonus (B) in Abhängigkeit von der Noradrenalkonzentration ohne (●) und mit (●) Propranolol (10^{-7} mol/L) ($MW \pm SEM$, $n_{NA} = 11$; $n_{NA + PR} = 5$), $p < 0,001$ für Membranpotential (A): Noradrenalin gegenüber Noradrenalin + Propranolol bei allen Messpunkten, $p > 0,05$ für Gefäßtonus (B): Noradrenalin gegenüber Noradrenalin + Propranolol bei allen Messpunkten.

3.2.10 Gefäßtonus unter Phentolamin plus Propranolol und Adrenalin

Gibt man zu einem Gefäß in Adrenalin die AR-Antagonisten Phentolamin + Propranolol, so zeigt die Dosiswirkungskurve einen kontraktiven Effekt gegenüber A allein. Das Maximum liegt mit $2,466 \pm 0,342$ g bei 10^{-5} mol/L A (Tabelle 2). Im Vergleich zu A betrug der Tonusanstieg 49,3 % ($p = 0,062$; A 10^{-5} mol/L + PR gegenüber A 10^{-5} mol/L). Dieses Maximum fand sich auch bei der Potentialmessung mit $-43,8 \pm 0,2$ mV signifikant gegenüber dem Messpunkt bei gleicher A-Konzentration ohne Antagonisten ($p < 0,001$). Potential- und Tonusmessungen verliefen parallel und wiesen bei 10^{-3} mol/L A eine Kontraktion von 0,021 g ($p > 0,05$) und Depolarisation von 0,3 mV ($p < 0,001$) gegenüber dem Ausgangswert in Krebslösung auf.

3.2.11 Gefäßtonus unter Phentolamin plus Propranolol und Noradrenalin

Die Applikation beider AR-Antagonisten zeigte in NA im Konzentrationsbereich 10^{-8} bis 10^{-4} mol/L verglichen mit der NA-Messreihe einen dilatativen Effekt (Tabelle 2). Die größte Tonusminderung fand sich mit $1,690 \pm 0,192$ g bei 10^{-3} mol/L NA ($p = 0,73$; gegenüber dem Ausgangswert in Krebslösung). Die Potentialkurve zeigte bei derselben Konzentration mit $-50,2 \pm 0,1$ mV eine Hyperpolarisation gegenüber NA ($p < 0,001$).

3.3 Konzentration zyklischer Nukleotide

Bestimmt wurde die Konzentration zyklischer Nukleotide am Ende der Kraftmessungen bei 10^{-3} mol/L des jeweiligen Katecholamins. Für jede Versuchsreihe wurden Doppelbestimmungen der cAMP- und cGMP-Konzentration durchgeführt. Anschließend wurde der Mittelwert berechnet. Wie in der Einleitung beschrieben, liefern die cAMP- und cGMP-Konzentrationen Hinweise auf eine Aktivierung der α - und β -AR. So geht eine Dilatation über postsynaptische β -AR mit einer Erhöhung der Spiegel zyklischer Nukleotide einher. Tabelle 4 zeigt eine Übersicht der gemessenen Konzentrationen.

Tabelle 4: cAMP- und cGMP-Konzentrationen bei Krebslösung, Katecholaminen 10^{-3} mol/L und AR-Antagonisten (MW \pm SEM), ($n_{\text{Krebs}} = 6$, $n_{\text{A}} = 12$, $n_{\text{NA}} = 11$, $n_{\text{Katecholamin} + \text{AR-Ant}} = 5$, $n_{\text{Katecholamin} + \text{beide AR-Ant}} = 8$).

Substrat	Nukleotidkonzentration [nmol/L]	
	cAMP	cGMP
Krebslösung	82,438 \pm 6,360	7,250 \pm 0,850
Krebs + PH	23,247 \pm 1,912	2,173 \pm 0,408
Krebs + PR	27,014 \pm 1,720	1,985 \pm 0,292
Krebs + PH + PR	110,164 \pm 6,541	11,469 \pm 0,354
Adrenalin	110,854 \pm 6,884	11,287 \pm 1,050
Adrenalin + PH	48,985 \pm 1,164	2,444 \pm 0,322
Adrenalin + PR	42,165 \pm 1,690	1,718 \pm 0,416
Adrenalin + PH + PR	60,592 \pm 5,006	3,876 \pm 0,421
Noradrenalin	100,868 \pm 10,050	9,059 \pm 0,907
Noradrenalin + PH	29,350 \pm 1,398	0,342 \pm 0,086
Noradrenalin + PR	39,577 \pm 2,798	1,473 \pm 0,122
Noradrenalin + PH + PR	72,913 \pm 10,575	5,676 \pm 0,726

Unter Adrenalin ergab sich gegenüber Krebslösung ein Anstieg der cAMP-Konzentration um 34,5 % ($p < 0,01$) (Tabelle 4). Für Noradrenalin betrug dieser 22,4 % ($p = 0,30$). Bei cGMP lag der unter A gemessene Wert 55,7 % über dem in Krebslösung ($p < 0,01$). Unter NA ergab sich eine nicht signifikante Steigerung von 24,9 % (Tabelle 4).

Alle unter AR-Blockade ermittelten Werte für die cAMP- und cGMP-Konzentration außer NA + PH + PR lagen signifikant unter den Konzentrationen in Krebslösung. Unter PH ergab sich eine um 71,8 % geringere cAMP-Konzentration. Die Zugabe von 10^{-7} mol/L PR hatte eine Reduktion um 67,2 % zur Folge. Bei äquimolarer Applikation beider Antagonisten (jeweils 10^{-7} mol/L) fand sich ein Anstieg der cAMP-Konzentration um 33,6 % (Tabelle 4). Die Konzentrationsverluste von cGMP bei Blockerapplikation betragen unter PH 70 %, unter PR 72,6 %. Bei Applikation von PH + PR stieg die cGMP-Konzentration um 58,2 %.

Analog zu den Messreihen des Koronarotonus (Tabelle 2), die eine Kontraktion unter jedweder AR-Blockade im Vergleich zu Adrenalin aufwiesen, minderten AR-Antagonisten die cAMP- und

cGMP-Konzentration. Bei PH betrug die cAMP-Konzentrationsminderung 55,8 % ($p < 0,001$). Die cAMP-Konzentration unter A + PR war um 62,0 % vermindert ($p < 0,001$). Beide AR-Antagonisten in Kombination bewirkten eine Abnahme von 45,3 % ($p < 0,001$). Die cGMP-Messungen ergaben bei α -AR-Blockade im Vergleich zu Adrenalin eine Konzentrationsminderung von 78,3 % ($p < 0,001$). PR verminderte den cGMP-Spiegel um 84,8 % ($p < 0,001$). Die Gabe beider AR-Antagonisten führte zu einem Konzentrationsabfall von 65,6 % ($p < 0,001$) (Tabelle 4).

Für NA galt ebenso wie für A, dass sich im Einklang mit dem unter AR-Blockade gesteigerten Koronartonus (Tabelle 2), die cAMP- und cGMP-Konzentration im Vergleich zu NA verminderten. So fand sich für cAMP unter PH eine Konzentrationsreduktion um 70,9 % ($p < 0,05$). Eine β -AR-Blockade hatte eine Reduktion von 60,8 % zur Folge ($p < 0,001$). Unter PH + PR wurde ein Abfall von 27,7 % gemessen ($p = 0,08$) (Tabelle 4). Eine ähnlich hohe Konzentrationsminderung durch AR-Blockade findet sich bei cGMP. Unter PH wurde ein Verlust von 96,2 % ($p < 0,001$) unter PR ein Abfall von 83,7 % ($p < 0,001$) gefunden. Die Applikation beider AR-Antagonisten in Kombination bewirkte eine Verminderung von 27,3 % ($p < 0,01$).

3.4 Betrachtung des Gesamtmodells

Vergleicht man die Konzentrationen von cAMP und cGMP mit den prozentualen Tonusveränderungen der glatten Muskulatur, so findet sich eine Korrelation bei den Messreihen mit A und NA mit und ohne AR-Blockade. Niedrige Konzentrationen zyklischer Nukleotide gehen mit einem hohen Gefäßtonus, also einer vasokonstriktorisches Antwort einher. Hingegen sind hohe Nukleotidkonzentrationen mit einem Tonusabfall assoziiert, der eine Vasodilatation zur Folge hat.

3.4.1 Katecholamine mit AR-Antagonisten

Sowohl bei A als auch bei NA zeigte sich für cAMP im Vergleich zu cGMP eine stärkere prozentuale Konzentrationsänderung. Dies galt ebenfalls für die Messreihen mit AR-Antagonisten. Lediglich bei NA + PH + PR konnte mit -27,7 % bei cAMP im Vergleich zu -27,3 % bei cGMP eine leicht dominierend-cAMP-vermittelte Reaktion festgestellt werden.

Gegenüber Krebslösung fanden sich nur bei A und NA sowie Krebs + PR + PH cAMP- und cGMP-Konzentrationsanstiege. Übereinstimmend ergab die Tonusmessung bei A (10^{-3} mol/L) 12,7 % Tonusabfall, bei NA (10^{-3} mol/L) 8,9 % Tonusreduktion (Tabelle 2). Unter AR-Blockade schwankte die cGMP-Konzentrationsminderung zwischen 27,3 % bei NA + PH + PR und 96,2 % bei NA + PR. In Übereinstimmung mit dem Konzentrationsabfall der zyklischen Nukleotide unter

β -AR-Blockade fand sich bei A + PR gegenüber Krebslösung ein Tonusanstieg von 21,0 %, bei NA + PR eine Tonuszunahme von 21,6 % (Tabelle 2).

Gegenüber A ergab sich nach β -AR-Blockade eine cGMP-Reduktion von 84,8 %, was mit einer Tonussteigerung von 38,6 % korreliert. Die Antagonisierung des α -AR bewirkte eine cGMP-Konzentrationsminderung von 78,3 %, verbunden mit einer Tonussteigerung um 11,2 %. Gegenüber NA ergab sich nach β -AR-Blockade eine cGMP-Konzentrationsminderung von 83,7 %. Dies ist zu einer Tonussteigerung von 33,5 % korreliert. Die Antagonisierung des α -AR bewirkte ebenfalls eine cGMP-Reduktion um 96,2 %, verbunden mit einem Tonusanstieg um 39,2 %.

Die Kontrollmessungen mit Krebslösung + PH + PR zeigten hohe cAMP- und cGMP-Werte, was mit dem niedrigen Gefäßtonus korreliert. Gegenüber Krebslösung ergab sich ein cGMP-Anstieg von 58,2 %, eine cAMP-Steigerung von 33,6 %. In Analogie fand sich eine Tonusminderung von 33,9 %.

3.4.2 Chemomechanische Kopplung

Die Änderung des Gefäßtonus kann als von der Änderung der Nukleotidkonzentration abhängig betrachtet werden (Abbildung 5). Sowohl bei cAMP als auch bei cGMP zeigt sich ein signifikante lineare Korrelation beider Größen (Abbildung 5).

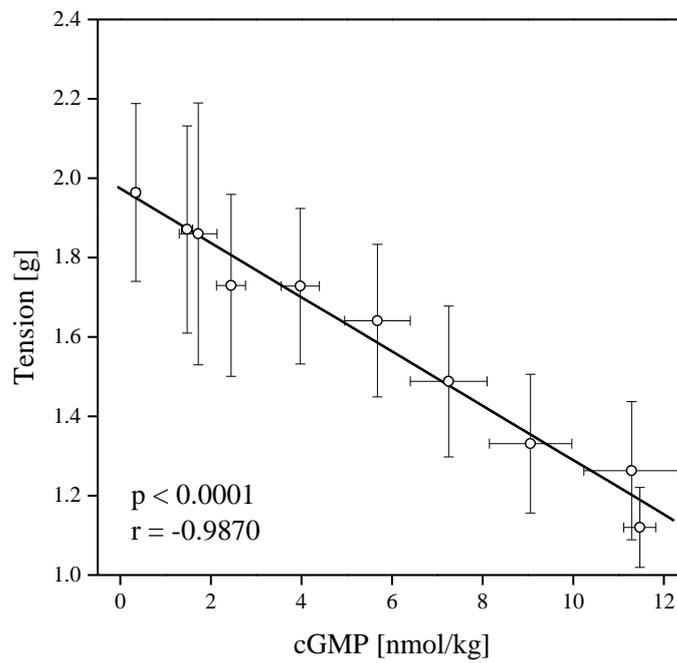
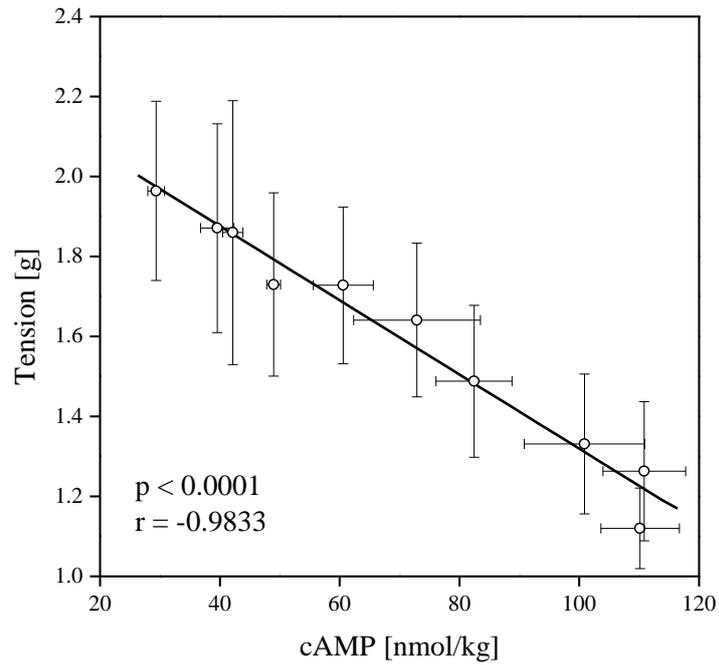


Abbildung 5:

Chemomechanische Kopplung: Gefäßtonus in Abhängigkeit von der cAMP- (A) und cGMP-Konzentration (B) (MW \pm SEM, n = 10).

3.4.3 Stationäre Aktivierungskurve

Stellt man den Gefäßtonus in Abhängigkeit vom Membranpotential dar, so ergibt sich die stationäre Aktivierungskurve. Der lineare Kurvenverlauf im Bereich von -45 mV bis -52 mV bestätigt eine intakte elektromechanische Kopplung (Abbildung 6).

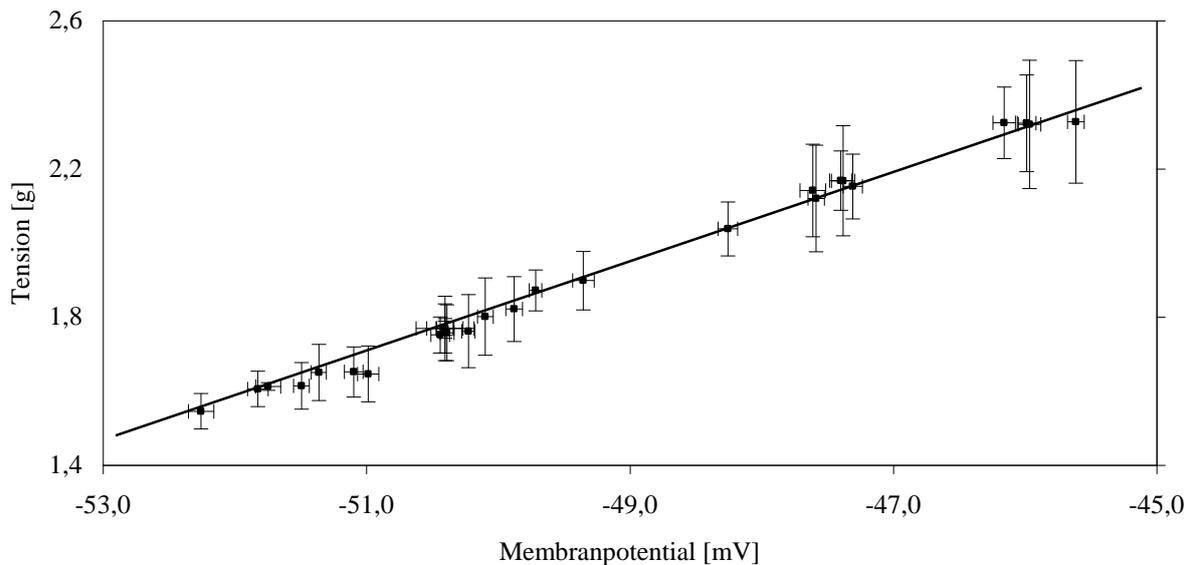


Abbildung 6:

Stationäre Aktivierungskurve für Adrenalin und Noradrenalin mit Antagonisten am glatten Gefäßmuskel von Koronararterien des Menschen (MW \pm SEM, n = 28), p < 0,001.

4 Diskussion

4.1 Katecholaminerge Einflüsse

Aus vorherigen Studien ist bekannt, dass die Katecholamine A und NA den koronaren Vasotonus über α - und β -AR beeinflussen [8, 29, 78]. Bei Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz kommt der koronaren Gefäßregulation besondere Bedeutung zu. Das verringerte Herzminutenvolumen, der reflektorische Frequenzanstieg, die daraus resultierende relative Diastolenverkürzung und geringere Koronarperfusion unterstreichen die Wichtigkeit der Regulation des koronaren Widerstandes [8, 65]. In diesem Zusammenhang ist der bei verringertem HMV erhöhte endogene NA-Plasmaspiegel von Bedeutung [65, 68]. Ziel der vorliegenden Arbeit ist die zusammenfassende Darstellung der Wirkung der Katecholamine A, NA und deren Antagonisten auf den Koronartonus. Während in vergleichbaren Studien nur der Gefäßtonus gemessen wurde, wird in dieser Arbeit neben der mechanischen Spannung das elektrische Potential in den glatten Gefäßmuskelzellen

sowie die Konzentration der zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP berücksichtigt. Somit wird eine Korrelation zwischen der Signaltransduktion über die Änderung biochemischer Marker mit dem Membranpotential und der resultierenden mechanischen Tonusänderung möglich. Verfolgt wird derselbe Ansatz bei der Entwicklung therapeutischer Optionen über die Modifikation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren zur gezielten Steuerung der katecholaminerg verursachten cAMP- und cGMP-Anstiege bei Herzinsuffizienz [10].

Eine Beeinflussung dieser sensiblen Signaltransduktion durch physiologischer Weise nicht vorkommende, hochkonzentrierte Substanzen wie 30 mmol/L KCl und SNP ist wahrscheinlich [54, 68]. Daher wurde in dieser Studie eine Vorspannung entsprechend dem arteriellen Mitteldruck von 100 mmHg als Referenzpunkt aller Messreihen verwendet [84]. Auch der für vorherige Studien typische Einsatz irreversibler AR-Antagonisten [29] sowie hochkonzentrierter Blockersubstanzen [29, 78], in denen für längere Zeiträume inkubiert wurde, wird dem Anspruch einer Simulation *in vivo* vorkommender Gefäßtonusregulation nicht gerecht. Vor dem Hintergrund einer möglichen β -AR-Sensitivierung [29] kam der Analyse der Vormedikation der Patienten, insbesondere einer Therapie mit β -AR-Antagonisten, besondere Bedeutung zu. Der Langzeiteinfluss einer Gabe von Betablockern auf diese Art von *in vitro* Tonusmessungen war ebenfalls noch nicht untersucht worden.

4.1.1 Noradrenalin

Unter NA fiel neben der bekannten α -AR-vermittelten Vasokonstriktion im mittleren NA-Konzentrationsbereich eine bei 10^{-8} bis 10^{-7} und bei 10^{-4} bis 10^{-3} mol/L registrierte Vasodilatation auf, die eine agonistische Wirkung am dilatativen β -AR nahe legte. Diese Vasodilatation unter NA war für geringe Konzentrationen von $2 \cdot 10^{-7}$ und $3 \cdot 10^{-7}$ mol/L NA bereits von *Sun et al.* [78] beschrieben worden. Der in der vorliegenden Arbeit gezeigte konstriktorische NA-Effekt in den Bereichen von 10^{-6} bis 10^{-5} mol/L ebenso wie die Dilatation bei 10^{-4} bis 10^{-3} mol/L NA stellen neue Befunde dar. Die Vergleichbarkeit beider Arbeiten ist eingeschränkt, weil *Sun et al.* [78] mit einem intraluminalen Druck von 60 mmHg arbeiteten, während in der vorliegenden Arbeit durch das Vorspannen auf 2 g ein arterieller Mitteldruck von 100 mmHg simuliert wurde. *Ferro et al.* [29] ermittelten bei 10^{-4} und $5 \cdot 10^{-6}$ mol/L NA eine Dilatation von 50 und 53 % im Vergleich zu 0,1 M Natriumnitroprussid (SNP). *Berkenboom et al.* [13] fanden bei 10^{-5} mol/L NA im Vergleich zum Koronartonus unter 30 mmol/L KCl ebenfalls um 12 ± 4 % dilatierte Gefäße. Bei diesen Konzentrationen zeigte sich in dieser Arbeit eine Vasokonstriktion, die erst bei 10^{-4} mol/L NA von einer Tonusreduktion im Vergleich zu Krebslösung abgelöst wurde.

Bestätigend für den Verlauf des Koronartonus ist die Analogie zum Membranpotential unter gleichen Versuchsbedingungen. Auch die Konzentrationen der zyklischen Nukleotide mit 22,4 % Steigerung für cAMP und 24,9 % für cGMP bei 10^{-3} mol/L NA bestätigen die Relaxation des Gefäßes bei hohen NA-Konzentrationen. *Berthouse et al.* [15] postulierten neben der cAMP-abhängigen Vasodilatation für das Myokard ein kardiales Remodeling. Der Anstieg von cAMP und cGMP bei hohen Katecholaminkonzentrationen zeigt in dieser Studie, dass es sich bei den Tonus- und Potentialuntersuchungen in Abgrenzung zu vasodilatativen *postmortem*-Veränderungen um vitale Koronarpräparate handelte. Ob der in der vorliegenden Arbeit elektrisch und mechanisch verifizierte kontraktile Effekt bei mittleren NA-Konzentrationen ein biochemisches Korrelat in Form höherer cAMP- und cGMP-Konzentrationen hat, bleibt noch zu untersuchen.

Die unerwartet starke Vasodilatation bei 10^{-3} mol/L NA könnte zudem durch die β -Blocker-Vormedikation, die 15 von 19 Patienten erhalten hatten, hervorgerufen worden sein. Von *Ferro et al.* [29] wurde im rechten Vorhof eine β_2 -AR-Sensitivierung nach β_1 -AR-Blockade festgestellt. Acht der 15 Patienten waren mit den unspezifischen β -AR-Antagonisten Carvedilol und Sotalol vorbehandelt, die übrigen sieben hatten β_1 -selektive AR-Antagonisten erhalten. Die geringen Aktivierungsschwellenwerte am β -AR mit $2,91 \cdot 10^{-10}$ mol/L für NA und $6,45 \cdot 10^{-16}$ mol/L für A könnten einen Hinweis auf eine β -AR-Sensitivierung durch Betablockermedikation geben. *Ferro et al.* [26] hatten bei Patienten ohne Betablockermedikation EC_{20} -Werte von $10^{-6,9}$ mol/L für NA und 10^{-7} mol/L für A ermittelt [29].

Die unter 10^{-4} bis 10^{-3} mol/L NA *in vitro* erstmals gezeigte signifikante Hyperpolarisation legt die Vermutung nahe, dass auch ein hoher endogener NA-Plasmaspiegel, wie er beispielsweise im Rahmen einer allgemeinen Sympathikusaktivierung bei peripherer Hypoperfusion durch verminderte Ejektionsfraktion (EF) vorkommt [65], durch koronare Vasodilatation einen kardioprotektiven Effekt haben könnte. Das Ausmaß dieses möglichen Einflusses bedarf allerdings näherer Quantifizierung in zukünftigen *in vivo* Studien. Würde sich dieser Effekt bei hohen A- und NA-Konzentrationen bestätigen, wäre nach reiflicher Risiko-Nutzen-Abwägung ein weniger restriktiver Einsatz therapeutischer Katecholamine bei akuten NYHA IV-herzinsuffizienten Patienten denkbar. Interessant wäre ebenfalls, ob das intensivmedizinisch zur Blutdruckstabilisierung eingesetzte NA *in vivo* ebenfalls eine koronar vermittelte kardioprotektive Wirkung besitzt. Vor dem Hintergrund der bekannten Desensitivierung myokardialer β_1 -AR bei längerfristig erhöhten endogenen NA-Spiegeln bedarf es einer differenzierten Evaluation dieses möglichen kardioprotektiven, koronardilatativen Effektes bei chronischer Herzinsuffizienz.

4.1.2 Adrenalin

Die erwartete β -AR-vermittelte Vasodilatation im gesamten Konzentrationsbereich von Adrenalin konnte in dieser Arbeit durch Versuche bei 19 NYHA-IV-herzinsuffizienten Patienten bestätigt werden. Während *Ferro et al.* [29] im Vergleich zu SNP eine 38 %ige Relaxation feststellten, ergab sich hier im Vergleich zu Krebslösung 12,7 % Tonusminderung durch A. Es fällt auf, dass in beiden Studien die höchste prozentuale Relaxation zwischen 10^{-7} und 10^{-6} mol/L A erreicht wurde. *Schwinger et al.* [66] hatten bei Patienten ohne Betablocker- und kalziumantagonistische Vormedikation einen konzentrationsabhängigen Anstieg ($3 \cdot 10^{-7}$ bis $3 \cdot 10^{-4}$ mol/L A) der mechanischen Spannung beobachtet. Das lässt vermuten, dass der gezeigte dilatative A-Effekt eventuell auf die Betablocker-Vormedikation bei 15 von 19 Patienten zurückzuführen sein könnte. Die von *Schwinger et al.* für die Herzinsuffizienz postulierte Entkopplung der AC vom β_2 -AR und der damit verbundene vasokonstriktorische Effekt [66] konnte nicht bestätigt werden.

Die Hyperpolarisation unter A in Kombination mit dem Anstieg der zyklischen Nukleotide von 34,5 % bei cAMP und 55,7 % bei cGMP steht im Einklang mit der Dilatation. Somit konnte ein dominierend β -AR-vermittelter koronardilatativer Effekt erneut nachgewiesen werden, der die kardioprotektive A-Wirkung unterstreicht. Zudem konnte gezeigt werden, dass auch exogen appliziertes A die gewünschte Gefäßdilataion hervorruft. Dies lässt eventuell Rückschlüsse auf einen koronardilatativen Einfluss von exogen appliziertem A bei herzinsuffizienten Patienten unter Betablockermedikation zu. Inwieweit dieser Effekt *in vivo* ebenfalls auftritt und ob er sich auch bei den im kardiogenen Schock applizierten β -Sympathomimetika zeigt, bleibt kritisch zu prüfen [40].

Der für eine kombinierte A- und NA-Freisetzung anhand der Einzeldosiswirkungskurven berechnete Koronartonus ergibt im gesamten Konzentrationsbereich von 10^{-8} bis 10^{-3} mol/L eine Vasodilatation, die bei $1,42 \cdot 10^{-5}$ mol/L ein Minimum aufweist. Zusätzlich zur flussabhängigen Dilatation könnte der koronare Gefäßtonus durch Variation der Katecholaminkonzentration um weitere 25 – 150 % reduziert werden [43]. Könnte dieser Effekt an einem größeren Patientenkollektiv bestätigt werden, so ließe das dilatative Potential von A und NA den bisher sehr zurückhaltenden Einsatz dieser Katecholamine am Übergang zur Herztransplantation [40] neu bedenken. Die sehr heterogene klinische Studienlage zu einem möglichen Vorteil einer katecholaminergen Brückentherapie vor der Transplantation bei terminaler Herzinsuffizienz macht eine differenzierte Risiko-Nutzen-Abwägung unabdingbar [45, 47]. Neben der zurzeit intensiv betriebenen Forschung über Endothelinrezeptor-Antagonisten und Antizytokine [26] ergäben sich hier vielleicht neue Therapieoptionen.

4.2 Beeinflussung durch Adrenorezeptorantagonisierung

4.2.1 Intrinsische Aktivität der AR-Antagonisten

In vitro Studien, bei denen Verhalten und Anzahl koronarer Adrenorezeptoren analysiert wurden, weisen eine große Heterogenität der Ergebnisse abhängig vom verwendeten Verfahren auf. Radioligandenbindungsstudien, in denen AR-Antagonisten appliziert wurden, ergaben deutlich verschiedene Resultate [8]. Neben unterschiedlicher Sensitivität und Spezifität könnte den Differenzen eine intrinsische Aktivität der AR-Antagonisten zugrunde gelegen haben. Der in dieser Arbeit erstmals gezeigte, ausgeprägt dilatatorische Effekt bei AR-Blockade durch α -, β - und beide Antagonisten (siehe Tabelle 2) könnte durch folgende Faktoren verursacht worden sein:

- In den Vesikeln terminaler sympathischer Nervenendigungen noch vorhandenes NA [32, 36] könnte freigesetzt worden sein und zusammen mit den Blockersubstanzen eine Tonusänderung bewirkt haben.
- Trotz Spülung in Krebslösung im Gefäßlumen noch vorhandenes A und NA könnte zusammen mit den AR-Antagonisten den Tonus beeinflusst haben.

Wenn diese Erklärungsversuche zutreffen, hätte sich wahrscheinlich eine Wandspannung ergeben, die auf der Dosiswirkungskurve läge, die durch exogen appliziertes NA gemessen wurde. Die Tonusmesswerte zeigen, dass dem bei 10^{-3} mol/L ermittelten NA-Tonusverlust von 8,9 % und A-Tonusverlust von 12,7 % die nur durch AR-Blockerzugabe erzielten Tonusminderungen von über 20 % gegenüberstehen (Tabelle 2). Zur Erklärung könnte man entweder eine endogene NA-Konzentration $> 10^{-3}$ mol/L annehmen oder eine intrinsisch-dilatative Aktivität der AR-Antagonisten vermuten. Geht man von einer Katecholaminproduktion von 8 – 10 ng/kg Körpergewicht pro Minute im Nebennierenmark aus [65], so ergibt sich für einen 70 kg schweren Menschen eine NA-Plasmakonzentration in Ruhe von $2,95 \cdot 10^{-8}$ mol/L unter der Annahme, dass im Nebennierenmark nur 20 % auf NA-Produktion entfallen und lediglich 5 % des Gesamtplasmaspiegels produziert werden [68]. Als Referenzwerte für beide Katecholamine werden in Ruhe $5 \cdot 10^{-10}$ bis $1 \cdot 10^{-6}$ mol/L angegeben [34]. Dass durch Freisetzung von NA aus terminalen Nervenendigungen plötzlich Spiegel von größer als 10^{-3} mol/L erreicht werden, erscheint vor diesem Hintergrund unwahrscheinlich.

Ferro et al. [29] verhinderten eine endogene NA-Freisetzung, indem sie 25 mmol/L KCl applizierten. Damit gingen sie allerdings das Risiko einer Beeinflussung der physiologischen Signaltransduktion ein. Ihre konstriktiven intrinsischen Effekte sind daher eher auf im Gefäßlumen verbliebenes A und NA zurückzuführen. Da in dieser Arbeit die dilatativen Effekte bei AR-Antagonistenzugabe über 20 % betragen, erscheint eine intrinsische Rezeptoraktivierung wahrscheinlich.

Auch die Konzentration zyklischer Nukleotide suggeriert einen vom Katecholamin unabhängigen Effekt. Bei PH + Krebs und PR + Krebs ergaben sich im Vergleich zu Krebslösung signifikante prozentuale Konzentrationsminderungen. Da Potential und Tonus eine Hyperpolarisation bzw. Vasorelaxation zeigen, kann die intrinsische Blockerwirkung nicht über den klassischen Weg der AR-Aktivierung verlaufen. Möglich wäre ein der Adenosin-Signaltransduktion verwandtes, cAMP- und cGMP-unabhängiges Signaling über endotheliale K_{ATP} -Kanäle [38]. Dennoch beeinflussen AR-Antagonisten ohne exogene Katecholaminzugabe offensichtlich die cAMP- und cGMP-Konzentration, was einer weiteren Überprüfung bedarf.

4.2.2 Korrelation zwischen Tonus, Potential und zyklischer Nukleotidkonzentration

Bei der Applikation von Katecholaminen und AR-Kombinationen konnte erstmals an Koronararterien des Menschen ein analoger Verlauf von Tonus und Potential festgestellt werden. Dies weist neben einer hohen Messgenauigkeit auf eine intakte elektromechanische Kopplung hin. Darüber hinaus stehen erniedrigte cAMP- und cGMP-Konzentrationen mit kontraktile Effekten im Einklang. Die stärkste Depolarisation fand sich unter NA (10^{-4} mol/L) + PR auf -43,4 mV und ging einher mit einem Tonusanstieg auf 2,325 g. A (10^{-5} mol/L) mit β -AR-Blockade führte ebenfalls zu massiver Depolarisation auf -44,6 mV, die mit der größten Tonussteigerung auf 2,328 g einherging. Der kontraktile Effekt unter β -AR-Blockade bestätigt die β -AR-vermittelte dilatative Wirkung von A auf Koronararterien. Dass unter NA + PR ein annähernd gleich hoher Gefäßtonus erzielt wurde, spricht für eine ausgeprägte Wirkung von NA auch am β -AR, die bisher in der Literatur nicht beschrieben wurde. Auffällig war zudem, dass beide Katecholamine unter β -AR-Blockade ihr Kontraktionsmaximum bei A- und NA-Konzentrationen erreichten, die über der in Ruhe physiologischen Plasmakonzentration lagen. Solche Konzentrationen können jedoch bei hohem Sympathikotonus im Rahmen einer terminalen Herzinsuffizienz durchaus auftreten. [32, 36].

Die Messdaten geben Anlass, die Medikation mit nichtselektiven β -AR-Antagonisten bei Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz kritisch zu überdenken. Eine Überprüfung des dargestellten kontraktile Einflusses von Propranolol auf Koronararterien bei *in vivo* Studien wäre in diesem Zusammenhang wünschenswert. Im Folgenden soll der Einfluss von AR-Blockade und Katecholaminen auf den Koronartonus diskutiert werden.

4.2.3 α -Adrenorezeptor-Blockade

Die Blockade der α -AR ließe einen dominierend β -AR-vermittelten dilatativen Effekt vermuten, der in dieser Arbeit jedoch nicht bestätigt werden konnte. Nach 105-minütiger Applikation von Katecholaminen (10^{-3} mol/L) in Kombination mit 10^{-7} mol/L PH ergab sich bei NA eine

Tonuszunahme von 26,9 % und unter A eine Tonusabnahme von 2,9 % im Vergleich zum Ausgangspunkt in Krebslösung (Tabelle 2). Im Vergleich zu A und NA (10^{-3} mol/L) bewirkte das jeweilige Katecholamin + PH eine Kontraktion. Aufgrund der Verwendung des unspezifischen AR-Antagonisten PH liegt eine antagonistische Wirkung am präsynaptischen α_2 - und postsynaptischen α_1 -AR nahe. Mittels selektiver Rezeptorsubgruppenblockade konnte in früheren Arbeiten eine sowohl postsynaptische α_1 - als auch präsynaptische α_2 -AR-bedingte Vasokonstriktion festgestellt werden [8]. Bekannt ist ebenfalls der negative Rückkopplungsmechanismus präsynaptischer α_2 -AR zur Begrenzung der NA-Freisetzung aus den Varikositäten [65]. *Ferro et al.* [29] simulierten bei vergleichbarer Versuchsanordnung eine komplette α -AR-Blockade, indem sie eine Stunde vor Versuchsbeginn 10^{-5} mol/L Phenoxybenzamin applizierten. Ausgangspunkt ihrer Messung war die durch 25 mmol/L KCl hervorgerufene maximale Kontraktion. Es ergaben sich Effekte von 57 % Relaxation unter NA und 50 % Tonusabnahme unter A. Folgende Erklärungen für die Diskrepanz zu unseren Ergebnissen sind denkbar:

- Möglicherweise wurden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit durch endogenes, noch in terminalen Nervenendigungen vorhandenes NA beeinflusst [29, 68]. Bei NA-Spiegeln zwischen 10^{-6} mol/L und 10^{-5} mol/L könnte der kontraktile NA-Effekt die in anderen Studien postulierte Dilatation unter α -AR-Blockade überlagert haben. Fanden sich in den Varikositäten noch noradrenalinhaltige Vesikel, könnte eine Antagonisierung des präsynaptischen α_2 -AR eine verstärkte NA-Freisetzung herbeigeführt haben. Diese mögliche Wechselwirkung des endogenen NA wurde einer unphysiologischen Beeinflussung der Signaltransduktion am AR durch KCl vorgezogen.
- Unter *Ferros* 21 Patienten fand sich keiner mit Betablockervormedikation, während in der vorliegenden Studie 15 von 19 Personen β -AR-antagonistische Medikamente einnahmen.
- Die im Vergleich zur Relaxation bei 0,1 mmol/L SNP ermittelten prozentualen Dilatationen *Ferros* sind mit den prozentualen Relaxationen nach Vorspannung auf 2 g in Krebslösung nicht vergleichbar. SNP als Referenzpunkt birgt das Risiko einer Veränderung der AR-Signaltransduktion.
- *Ferro* inkubierte zu Versuchsbeginn für 60 min in 10^{-5} mol/L Phenoxybenzamin. In dieser Arbeit wurden 10^{-7} mol/L Phentolamin bei steigenden Katecholaminkonzentration eingesetzt. Dies nähert sich einer *in vivo* Situation insofern besser, als vermutlich nie ein katecholaminfreier Zustand in der Gefäßwand erreicht wird [68].

Ferro et al. [29] haben bei α -Reptorblockade unter NA gegenüber A einen größeren dilatativen Effekt gemessen. Seine Messung bestätigt indirekt eine dominierend α -AR-vermittelten NA-Antwort und β -AR-vermittelten A-Antwort. Der in dieser Arbeit gezeigte stärker dilatative Effekt

von A ohne AR-Antagonisten unterstreicht die Effizienz der α -AR-Blockade bei *Ferro et al.* [29]. Der in der vorliegenden Studie ermittelte Schwellenwert für das Ansprechen der β -AR lag bei A mit $6,45 \cdot 10^{-16}$ mol/L deutlich geringer als bei NA.

Adrenalin

Unter 10^{-3} mol/L A + PH wurde verglichen mit Krebslösung eine geringfügige Vasodilatation festgestellt. Bei 10^{-8} bis 10^{-4} mol/L A + PH zeigte sich ein kontraktiler Effekt. Da der Aktivierungsschwellenwert am α -AR für A nach unseren EC_{50} -Berechnungen bei $3,25 \cdot 10^{-9}$ mol/L liegt, kann der unter PH bei $> 10^{-3}$ mol/L A beobachtete Effekt auf eine suffiziente α -AR-Antagonisierung zurückgeführt werden. Der im niedrigen A-Konzentrationsbereich unter PH gezeigte konstriktorische Effekt ist schwer erklärbar. Möglich wäre eine pharmakologische Interaktion am Endothelinrezeptor mit nachfolgender Vasokonstriktion. Da die cAMP-Konzentration unter A + PH im Vergleich zu A alleine deutlich erniedrigt ist, scheint ein Wirkmechanismus über inhibitorische G-Proteine wahrscheinlich. Die signifikant erniedrigte cGMP-Konzentration lässt zudem eine endothelial vermittelte Konstriktion vermuten, die über eine Interaktion mit der NO-Synthase stattgefunden haben könnte. Möglich wäre ebenfalls eine präsynaptische α_2 -AR-Antagonisierung mit nachfolgender verstärkter NA-Ausschüttung aus terminalen Nervenendigungen, die zu dem kontraktilen Effekt beigetragen haben könnte. Gegen eine zu geringe Blockerkonzentration spricht, dass bei gleicher PH Konzentration (10^{-7} mol/L) und 10^{-3} mol/L A ein dilatativer Effekt gegenüber Krebslösung auftrat. Dieser Effekt bestätigt die dilatative A-Wirkung über β -Adrenorezeptoren. 16 von 19 untersuchten Patienten war mit β -Blockern vorbehandelt. Der gezeigte Tonusverlust bei 10^{-3} mol/L A + PH könnte durch eine Kreuzsensitivierung von β_2 -AR [29] bei chronischer β -AR-Stimulation verstärkt worden sein. Die für das Myokard postulierte Herunterregulation der β -AR-Dichte bei langfristiger Einnahme von β -Blockern [52] erscheint damit für Koronararterien weniger wahrscheinlich. Aufgrund des gering ausgeprägten Effektes wäre eine Überprüfung mit selektiven α -AR-Antagonisten an Koronararterien mit und ohne Endothel wünschenswert.

Noradrenalin

Die in der Literatur vielfach gezeigte, α -AR-vermittelte konstriktorische NA-Wirkung an Arteriolen [68] konnten wir bei alleiniger Zugabe von NA an Koronararterien für den Konzentrationsbereich 10^{-6} bis 10^{-5} mol/L bestätigen. Unter NA + PH kam es zu einer Tonuszunahme mit einem Maximum von 2,352 g bei 10^{-4} mol/L NA (Tabelle 2). Gegenüber Krebslösung wurde bei alleiniger Applikation von 10^{-3} mol/L NA ein relaxierender Effekt von 8,5 % registriert. Dies kann auf einen β -AR-vermittelten Einfluss von NA zurückgeführt werden. Unter α -AR-Blockade beschrieben

Ferro et al. [29] einen β -AR-vermittelten dilatativen Effekt. von NA Die abweichenden Ergebnisse beider Studien könnten erneut auf die unterschiedlichen Referenzmedien und Antagonisten zurückgeführt werden. Im Vergleich mit Krebslösung zeigte sich unter A + PH eine Dilatation von 2,9 % (Tabelle 2). Unter NA + PH zeigte sich eine Kontraktion. Dies steht im Einklang mit den geringeren Aktivierungsschwellenwerten für NA am β -AR (Tabelle 3).

4.2.4 β -Adrenorezeptor-Blockade

Die unter β -AR-Blockade erwartete α -AR-vermittelte Vasokonstriktion konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Sowohl unter A als auch unter NA ergaben sich eine starke Vasokonstriktion, Depolarisation und Abnahme der cAMP- und cGMP-Konzentration. Darauf aufbauend stellt die in Koronararterien des Meerschweinchens *in vivo* transgen induzierte Überexpression koronarer β_2 -AR mit in der Folge verbesserter linksventrikulärer Funktion einen neuen therapeutischen Ansatz dar [76].

Noradrenalin

Der von *Berkenboom et al.* [13] für NA (10^{-5} mol/L) mit Atenolol (10^{-6} und 10^{-5} mol/L) im Vergleich zur maximalen Kontraktion unter KCl (30 mmol/L) gezeigte Tonusanstieg wird in dieser Arbeit beim Vergleich von NA + PR mit NA bestätigt. Die unterschiedlichen Referenzgrößen und selektiven β -AR-Antagonisten verhindern jedoch eine sinnvolle Gegenüberstellung der prozentualen Werte. Die Dosiswirkungskurve zeigt eine maximale kontraktile Wirkung und Depolarisation bei 10^{-4} mol/L NA + PR. Dies weist auf eine ausgeprägte Wirkung von NA am β -AR hin. Der kontraktile Effekt von 31,4 % bei 10^{-4} mol/L NA + PR gegenüber Krebslösung lässt zudem eine *in vivo* auftretende Vasokonstriktion bei nicht-selektiver- β -AR-antagonistischen-Medikation befürchten. Die gezeigte Tonusänderung mittels PR erscheint besonders dramatisch, wenn man die Relaxation der Koronararterien um 8,9 % unter NA 10^{-3} mol/L bedenkt. Ein Teil der dilatativen Wirkung unter NA könnte allerdings auf eine β -AR-Sensitivierung durch die medikamentöse Vorbehandlung der Patienten mit Betablockern zurückzuführen sein. Da sowohl β_1 - als auch β_2 -AR an der koronaren Vasodilatation beteiligt sind, könnten daher auch bei nichtselektiven Betablockern positive Langzeiteffekte erzielt werden. Dies gilt es in Folgestudien mit einem größeren Patientenkollektiv zu untersuchen.

Adrenalin

Für Adrenalin konnte unter β -AR-Blockade eine α -AR-vermittelte Vasokonstriktion festgestellt werden, die von einer signifikanten Depolarisation und Abnahme von cAMP und cGMP begleitet wurde. Die bei 10^{-5} mol/L A + PR gezeigte Tonuszunahme von 40,9 % gegenüber A verringerte

sich bei 10^{-3} mol/L A auf 38,6 % (Tabelle 2). Die für A am α -AR ermittelte EC_{50} von $6,14 \cdot 10^{-6}$ mol/L (Tabelle 3) [43] stimmt mit dem gezeigten hohen Tonus bei gleicher A-Konzentration + PR gut überein. Dass die A- Dosiswirkungskurve im gesamten Konzentrationsbereich einen vasodilatativen Effekt zeigt, steht angesichts des für β -AR deutlich niedrigeren Aktivierungsschwellenwertes nicht im Widerspruch zur Kurve unter A + PR. Zudem könnte eine durch Betablocker ausgelöste β -AR-Kreuzsensitivierung stattgefunden haben.

4.2.5 α - und β -Adrenorezeptor-Blockade

Für Noradrenalin mit beiden AR-Antagonisten zeigte sich gegenüber NA bei 10^{-8} mol/L bis 10^{-4} mol/L eine Vasodilatation, die von einer signifikanten Hyperpolarisation begleitet wurde. Die cGMP-Konzentration lag mit 5,676 nmol/kg deutlich über der der übrigen Blockerversuche, blieb jedoch signifikant hinter dem NA-Wert von 9,059 nmol/kg zurück (Tabelle 4). Geht man von einer suffizienten Antagonisierung beider Rezeptorpopulationen aus, so bliebe noch im Gefäß vorhandenes A bzw. aus Vesikeln freigesetztes NA als Erklärung für die gemessenen Werte. Des Weiteren könnten präsynaptische β -AR aufgrund einer unspezifischen Blockade ebenfalls antagonisiert worden sein, was eine vasodilatative Gefäßantwort zur Folge hätte. Dies würde die relativ hohen cAMP und cGMP Konzentrationen erklären. Ob die gemessenen Effekte lediglich ein Artefakt darstellen oder ob sich die Erklärungshypothesen bestätigen, bleibt zukünftigen Studien überlassen.

Unter Adrenalin mit beiden Antagonisten zeigte sich im Vergleich zu A allein eine Vasokonstriktion, die bei 10^{-5} mol/L A ihr Maximum erreichte. Bei gleicher Konzentration fand sich eine signifikante maximale Depolarisation. Beide zyklischen Nukleotidkonzentrationen waren signifikant erniedrigt. Die geringe cAMP-Konzentration unterstreicht im Zusammenhang mit der Vasokonstriktion und Depolarisation eine α -AR-Aktivierung. Warum diese trotz PH-Applikation auftreten konnte, bleibt in zukünftigen Studien zu eruieren.

4.3 Bedeutung von Vormedikation und interindividuellen Risikofaktoren

Wie bereits in der Einleitung erläutert, wurden in der Literatur patientenspezifische Faktoren herausgearbeitet, die das Tonusverhalten von Koronararterien beeinflussen [9, 13, 35, 78]. Um eine Beeinflussung der Ergebnisse zu minimieren, fand eine Analyse des heterogenen Patientenkollektivs im Hinblick auf Prämedikation, Alter und kardiale Vorerkrankungen statt [3]. Diese Analyse lässt zwar aufgrund der geringen Patientenzahlen nur bedingt klinisch relevante Schlussfolgerungen zu, zeigt jedoch richtungweisende Effekte auf, deren Vertiefung in Folgestudien lohnenswert wäre. Die interindividuellen Unterschiede im Tonusverhalten fielen innerhalb der ersten zehn Minuten Kontrollmessung in Krebslösung zu Beginn jedes Versuches auf

(Abhängigkeit vom Patientenalter siehe Abbildung 1). Die Beschaffenheit und Funktionsfähigkeit des Endothels ist dabei ursächlich von großer Bedeutung für die Vasoaktivität, besonders für die Stressrelaxation. Diese wird maßgeblich über Heparansulfat-Proteoglykan, das als shear-stress-Sensor fungiert, gesteuert [73, 74]. Die in der Folge aktivierte NO-Synthase bewirkt über einen cGMP-Anstieg eine stressabhängige Vasorelaxation [73]. Ein weiterer wichtiger Mediator des Vasotonus ist Prostazyklin, welches über cAMP und cGMP einen dilatativen Einfluss hat [74]. Prostazyklin entsteht sowohl im Endothel als auch in der glatten Muskelzelle [74]. Im Studiendesign wurde von einer Denudation des Endothels auch deshalb abgesehen, weil die im Endothel lokalisierten β_1 - und β_2 -AR ebenso wie die glattmuskulären β -AR bei katecholaminerger Stimulation zur Dilatation des Gefäßes beitragen [22, 78]. β_3 -AR kommen in Koronararterien sogar nur im Endothel vor [22, 78]. Die vielfältigen Interaktionen von Endothel und glatter Muskulatur lassen in der experimentellen Anordnung eine physiologische, zusammenhängende Betrachtung beider Strukturen sinnvoll erscheinen. Zu Beginn jeder Messung fand eine 15-minütige Äquilibration jedes Präparates bei einem Fluss von 3 mL/min in Krebslösung statt. Die Berücksichtigung von zeit- und flussabhängigem Effekt ermöglichte eine Erfassung sowohl der basalen NO-Freisetzung, als auch der schubspannungsinduzierten NO-Bildung. Dadurch, dass sämtliche Messwerte auf dieses Verhalten in Krebslösung normiert wurden, dürfte eine unterschiedliche Fähigkeit der einzelnen Präparate zur Stressrelaxation die Ergebnisse nicht beeinflusst haben.

Die Beeinflussung durch individuelle AR-Polymorphismen könnte unbemerkt in der vorliegenden Studie stattgefunden haben [9, 19, 78]. Um differente Wirkprofile zu minimieren [78], wurden in allen Messreihen gleiche Katecholamin- und Blockersubstanzen von demselben Hersteller eingesetzt. Das unterschiedliche Wirkprofil verschiedener α - bzw. β -AR-Antagonisten schränkt die Vergleichbarkeit der vorliegenden Arbeit mit bisherigen Studien ein, in denen zum Teil andere Substanzen verwendet wurden. Um eine Dilatation durch Shear-Stress im Verlauf des Experimentes zu vermeiden [78], wurde die Strömungsgeschwindigkeit bei 3 mL/min konstant gehalten. Eine während der Phase des Vorspannens auf 2 g aufgetretene Stressrelaxation, wurde durch das 10-minütige Kalibrierungsverfahren zu Beginn jeder Messreihe kompensiert. Weitere interindividuelle Unterschiede dürften durch Normierung der Messung auf den nach weiteren 15 Minuten Inkubation in Krebslösung bei konstantem Fluss ermittelten Tonus relativiert worden sein. Dies scheint gerechtfertigt, da bei Zugabe der Pharmaka keine gegensätzlichen sondern nur qualitativ unterschiedliche Effekte gemessen wurden.

Der Arteriosklerosegrad der Gefäße [30, 41, 67], insbesondere die Endothelbeschaffenheit [25, 73] und das Patientenalter sind ebenfalls von großer Wichtigkeit für die katecholaminerge Beeinflussung des Gefäßtonus [6, 58]. Bisherige Studien zeigten, dass bei Erwachsenen - vermutlich arteriosklerotisch bedingt - eine α -adrenerge Kontraktion überwiegt, während NA bei Kindern hauptsächlich β -AR stimuliert [58, 72, 78]. Die Altersabhängigkeit der Tonusentwicklung konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Sowohl die Gruppe der 50- bis 59-Jährigen als auch die Kategorie der 40 bis 49 Jahre alten Patienten zeigten einen höheren Vasotonus als die Gruppe der 30- bis 39-jährigen Patienten. In der Literatur besteht Uneinigkeit über die Höhe des basalen Sympathikotonus, jedoch wurde in arteriosklerotischen Koronararterien eine stärkere α_1 -AR-Aktivierung festgestellt [65, 78]. Neben endothelialer Dysfunktion wurde auch eine verminderte β -AR-Wirkung bei Arteriosklerose bestätigt [6, 78]. In dieser Studie konnten Koronararterien von nur drei Patienten als arteriosklerotisch eingestuft werden. Eine signifikante Tonusänderung im Vergleich zur Restpopulation konnte nicht festgestellt werden. In der Literatur wurde mehrfach gezeigt, dass die Effektivität von A mit zunehmender Herzinsuffizienz abnimmt [6, 58]. Dies wird darauf zurückgeführt, dass sowohl die Sensitivität der koronaren β_1 -AR abnimmt, als auch ein Teil der β_2 -AR von der AC entkoppelt wird und damit ihre vasodilatatorische Wirkung verloren geht [6, 58]. Durch die Verwendung von Koronarmaterial von ausschließlich NYHA IV insuffizienten Patienten wurde diese Bias minimiert.

In der Literatur findet eine mögliche Beeinflussung des Koronartonus durch Desensitivierung [52] oder Kreuzsensibilisierung [29] von β -AR durch langfristige Betablockermedikation Erwähnung. In dieser Studie konnte anhand der Messwerte nach 15-minütiger Inkubation in Krebslösung kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit bzw. ohne Betablockermedikation festgestellt werden. Allerdings erhielten lediglich drei Patienten keine Betablocker. *Machida et al.* [50] beschrieben *in vivo* nach einwöchentlicher Carvedilolapplikation von 2,5 mg/ Tag eine signifikante Reduktion des NA-Plasmaspiegels in Ruhe und bei körperlicher Betätigung. Die ermittelte Carvedilol Konzentration im Plasma von 1,8 mg/L lag dabei unter dem Schwellenwert der β -AR-Blockade [50]. Geschlussfolgert wurde eine durch Carvedilol verbesserte NA-Wiederaufnahme in terminale Nervenendigungen [50]. Vor diesem Hintergrund erscheint eine Folgeanalyse mit größerer Patientenzahl sinnvoll. Der Vergleich des Koronartonus nach Therapie mit den nicht β_1 -selektiven Antagonisten Carvedilol und Sotalolol (35 Präparate von 8 Patienten) mit den selektiven Betablockern (34 Präparate von 7 Patienten) ergab eine nicht signifikante Tonusminderung bei Prämedikation mit β_1 -selektiven Antagonisten. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit der unter Betablockern postulierten β_2 -AR-Kreuzsensitivierung.

Eine Therapie mit Dobutamin und Dopamin (7 Patienten) zeigte keinen signifikanten Tonusunterschied zur Vergleichsgruppe. Mit Phosphodiesterasehemmern prämedizierte Patienten wiesen eine geringfügige, nicht signifikante Tonussteigerung ihrer Koronararterien in Krebslösung auf. Dies wurde noch nicht in der Literatur beschrieben. Untersuchungen an einer größeren Studienpopulation könnten den Befund eventuell verifizieren.

Folgende weitere Einflussfaktoren stellen Studienlimitationen dar:

- Der Zeitraum von maximal 36 Stunden zwischen Explantation des Herzens und Beginn des Versuches könnte Zellen durch oxidativen Stress geschädigt haben [31]. Um derartige Zustände zu vermeiden, wurden die Präparate vorher in karbogenisierter Krebslösung kühl und dunkel gelagert.
- Dadurch, dass die unspezifischen Rezeptorantagonisten Phentolamin und Propranolol verwendet wurden, kann der Einfluss der einzelnen AR-Subpopulationen auf den Gesamttonus nicht beurteilt werden. Dafür ermöglicht die Verwendung unspezifischer Rezeptorblocker die Gesamtschätzung eines nur α - und nur β -AR-vermittelten Effektes, der für die Interpretation der Katecholaminwirkung an speziellen AR-Subgruppen in möglichen Folgestudien hilfreich ist.
- Trotz des vorsichtigen Präparierens und Einspannens des Präparates in die Versuchsanlage könnten mechanisch endotheliale Schäden verursacht worden sein. Um solche Tonuschwankungen zu erkennen, wurden mehrere Versuche mit unterschiedlichen Koronaranteilen eines Patienten durchgeführt. Endothelschädigungen wären zudem später durch eine Abweichung des cGMP-Wertes aufgefallen.

4.4 Betrachtung des Gesamtmodells

Die Bestimmung des elektrischen Potentials, der mechanischen Wandspannung und der Konzentration der zyklischen Nukleotide ermöglicht Aussagen über die Kopplungsvorgänge zwischen Potential, Tonus und Biochemie [54, 68]. Stellt man den Gefäßtonus in Abhängigkeit von der zyklischen Nukleotidkonzentration grafisch dar, so ergibt sich für cAMP und cGMP ein linearer Zusammenhang. Dies bestätigt eine intakte chemomechanische Kopplung und verweist auf die bekannte negative Korrelation zwischen Gefäßtonus und Konzentration zyklischer Nukleotide.

Betrachtet man den mechanischen Tonus in Abhängigkeit vom intrazellulären Potential, so ergibt sich innerhalb eines Bereiches von -45 mV bis -52 mV ebenfalls ein linearer Zusammenhang (elektromechanische Kopplung). Diese bereits gut bekannte Relation beweist die Messgenauigkeit der in dieser Studie durchgeführten Untersuchungen [68]. Die Hyperpolarisation ist verbunden mit

dem Schließen von Ca^{2+} -Kanälen und einem simultanen Anstieg von K^+ -Auswärtsstrom und $^{42}\text{K}^+$ -Efflux [67, 69, 71, 74]. Der Einfluss zyklischer Nukleotide geht in die stationäre Aktivierungskurve über eine Zunahme der K^+ -Leitfähigkeit mit resultierender Dilatation ein [69]. In der Literatur wird ein Hinweis auf eine enge elektromechanische Kopplung in einer 50 %igen Vasorelaxation nach 2,5 mV Hyperpolarisation gesehen [69].

Unter den normalen Bedingungen eines dynamischen Kreislaufsystems sind die verschiedenen gefäßregulierenden Einflüsse so miteinander verwoben, dass die Reaktion einer glatten Muskelzelle nur unvollständig durch die stationäre Aktivierungskurve beschrieben wird. Unberücksichtigt bleiben in diesem Modell die elektrischen und mechanischen Oszillationen der glatten Gefäßmuskelzelle, die in der rhythmischen Aktivität der aktiven, elektrogenen Na^+/K^+ -Pumpe begründet liegen [70]. Die rhythmische Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase resultiert vermutlich aus den allosterischen Qualitäten der Phosphofruktokinase (PFK) [70]. Zusammen mit der ‚Flow-Sensor-Formation‘ stellen Na^+/K^+ -ATPase und PFK zentrale, nichtlineare und synergetische Parameter dar, die periodische Ereignisse im Herzkreislaufsystem initiieren können [70]. Die Bedeutung dieser Parameter gilt es in weiteren Untersuchungen im Zusammenhang mit dem klassischen Modell der elektromechanischen Kopplung zu evaluieren.

5 Zusammenfassung

Endogene Katecholamine sind in erheblichem Maße an der Tonusregulation der glatten Gefäßmuskulatur beteiligt. Dabei kommt der Perfusion der Koronararterien insuffizienter Herzen mit verkürzter Diastolendauer vor dem Hintergrund der myokardialen Pathophysiologie besondere Bedeutung zu. Die für die Tonusregulation der Gefäßmuskulatur mitverantwortlichen α - und β -Adrenorezeptoren werden abhängig von der Adrenalin- (A) und Noradrenalin (NA)- Konzentration unterschiedlich aktiviert. Die für Arteriolen typische α -Adrenorezeptor (AR)-vermittelte, konstriktorische Reaktion auf NA wird von einer β -AR-vermittelten, hauptsächlich von A hervorgerufenen, dilatativen Wirkung unterschieden. Dass Koronararterien eine von den Arteriolen anderer Organe verschiedene Affinität von A und NA am AR zeigen, wurde in früheren Studien mittels Rezeptorantagonisierung und Radioligandenbindung festgestellt. Der bei Herzinsuffizienz erhöhten Plasmakonzentration endogener Katecholamine wurde durch die verwendeten niedrigen Ruhe-Katecholaminkonzentrationen jedoch nicht Rechnung getragen. Ebenso lassen die Arbeiten eine Untersuchung des Katecholamineinflusses ohne vorherige Applikation von Rezeptorantagonisten vermissen. Die vorliegende Arbeit liefert erstmals eine umfassende Analyse der katecholaminvermittelten Tonusregulation mit/ ohne Rezeptorantagonisierung in Koronararterien NYHA IV-her-

zinsuffizienter Patienten ohne Applikation unphysiologischer Referenzsubstanzen und unter Berücksichtigung der vaskulär relevanten Vormedikation.

An intakten Koronararterien aus explantierten Herzen von 19 Patienten wurde die Tonusentwicklung mit einem induktiven Kraftaufnehmer und das intrazelluläre Membranpotential mit Mikroelektroden in Abhängigkeit steigender Katecholaminkonzentrationen bestimmt. Es folgte die Messung der intrazellulären Konzentration der zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP mittels ELISA. Tonus- und Potentialänderungen wurden in einem Katecholaminkonzentrationsbereich von 10^{-8} bis 10^{-3} mol/L untersucht. Um die selektive AR-vermittelte Wirkung von A und NA zu eruieren, wurde einigen Messreihen der unspezifische α -AR-Antagonist Phentolamin (10^{-7} mol/L), anderen der unspezifische β -AR-Antagonist Propranolol (10^{-7} mol/L) zugesetzt. Ein weiterer Ansatz enthielt beide Antagonisten.

Die Untersuchungen in Krebslösung ergaben einen signifikanten Tonusanstieg der Koronararterien von Patienten in der Altersgruppe über 40 Jahre im Vergleich zu Patienten im Alter zwischen 30 und 39 Jahren. Mit selektiven β_1 -AR-Antagonisten therapierte Patienten zeigten in der Kontrollmessung in Krebslösung einen niedrigeren Basaltonus als Patienten, die mit nichtselektiven β -AR-Blockern behandelt worden waren. Koronararterien von drei mit Phosphodiesterasehemmern therapierten Patienten wiesen einen erhöhten Tonus in Krebslösung auf. Eine Therapie mit Katecholaminen ergab keinen signifikanten Einfluss auf den basalen Gefäßtonus.

Unter Adrenalin zeigte sich eine biphasische Dosiswirkungskurve, die im gesamten Konzentrationsbereich von 10^{-8} bis 10^{-3} mol/L sowohl eine signifikante Tonusminderung mit Hyperpolarisation als auch bei 10^{-3} mol/L eine hohe cAMP- und cGMP-Konzentration aufwies. Die geringste Relaxation fand sich bei $2,8 \cdot 10^{-5}$ mol/L. NA bewirkte ebenfalls einen biphasischen Kurvenverlauf, mit einer geringen Relaxation bei 10^{-8} und 10^{-7} mol/L und einer stärkeren Dilatation bei 10^{-3} mol/L. Diese gingen mit einer signifikanten Hyperpolarisation im entsprechenden Konzentrationsbereich und einem signifikanten cAMP- und cGMP-Anstieg bei 10^{-3} mol/L einher. Mittels Fit für bisigmoidale Kinetiken konnten für A und NA niedrigere Erregungsschwellenwerte am β -AR ermittelt werden als am α -AR. Selbst bei kombinierter A- und NA-Freisetzung würde im gesamten Konzentrationsbereich von 10^{-8} bis 10^{-3} mol/L eine Vasodilatation resultieren, die bei $1,42 \cdot 10^{-5}$ mol/L ein Minimum aufwies [43]. Zusätzlich zur flussabhängigen Dilatation ($\Delta T = -0,253$ g) könnte der koronare Vasotonus durch Variation der Katecholaminkonzentration um weitere 25 – 150 % reduziert werden [43].

Die Applikation von 10^{-7} mol/L Phentolamin führte bei 10^{-3} mol/L A zu einer Tonusabnahme, die zusammen mit einer signifikanten Hyperpolarisation auf eine β -AR-vermittelte Dilatation hinweist. Unter NA in Kombination mit PH wurde eine Tonuszunahme festgestellt. Die Gabe von 10^{-7} mol/L Propranolol hatte sowohl für A als auch NA einen signifikanten Tonusanstieg in Kombination mit signifikanter Depolarisation und cAMP- und cGMP-Konzentrationsminderung zur Folge. Dabei zeigte sich unter 10^{-5} mol/L A ein Maximum mit einem Tonusanstieg von +0,558; unter NA von +0,554 g.

Messreihen, die im Ansatz lediglich die Blockersubstanzen in Krebslösung enthielten, zeigten bei beiden AR-Antagonisten eine ausgeprägte, jedoch nicht signifikante Tonusabnahme. Die zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP wiesen eine signifikante Konzentrationsminderung auf. Inwieweit diese das Korrelat einer intrinsischen AR-Wirkung darstellt, bleibt zukünftigen Studien vorbehalten.

Die vorliegende Arbeit bestätigt den für A an Arteriolen bekannten, β -AR-vermittelten, dilatativen Einfluss an Koronararterien des Menschen aus Herztransplantationen. Der erstmals beschriebene dilatative Einfluss von 10^{-3} mol/L NA könnte eine pathophysiologische Kompensation *in vivo* bei der mit schwerer Herzinsuffizienz einhergehenden verkürzten Diastolendauer zur Aufrechterhaltung einer ausreichenden Koronarperfusion darstellen. Ein solcher protektiver Effekt hätte bei reiflicher Risiko-Nutzen-Abwägung möglicher Weise Konsequenzen für den bisher zurückhaltenden Einsatz von A und NA bei terminaler Herzinsuffizienz im Überbrückungszeitraum bis zur Herztransplantation. Ergänzend unterstützt die unter Propranolol gezeigte Umkehr des dilatativen Effektes bei 10^{-8} bis 10^{-3} mol/L NA in eine ausgeprägte Vasokonstriktion die ohnehin kritische Sicht auf eine Therapie mit nicht- β_1 -selektiven Rezeptorantagonisten bei terminaler Herzinsuffizienz.

Literaturverzeichnis

- [1] Adebisi AA, Akinosun OM, Nwafor CE, Falase AO. Plasma catecholamines in Nigerians with primary hypertension. *Ethn. Dis.* 2011; 21:158-162.
- [2] Ahlquist R. A study of the adrenotropic receptors. *Am. J. Physiol.* 1948; 153:586-599.
- [3] Ahmed A. Chronic heart failure in older adults. *Med. Clin. North Am.* 2011; 95:439-461.
- [4] Amin P, Singh M, Singh K. β -Adrenergic receptor-stimulated cardiac myocyte apoptosis: role of β_1 integrins. *J. Signal Transduct.* 2011; 2011:179057. Epub 2011 May 24.
- [5] Barbato E, Bartunek J, Wyffels E, Wijns W, Heyndrickx GR, Bruyne B. Effects of intravenous dobutamine on coronary vasomotion in humans. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2003; 42:1596–1601.
- [6] Barbato E, Piscione F, Bartunek J, Galasso G, Cirillo P, De Luca G, Laccarino G, De Bruyne B, Chiariello M, Wijns W. Role of β_2 adrenergic receptors in human atherosclerotic coronary arteries. *Circ.* 2005; 111:288–294.
- [7] Bartunek J, Shah AM, Vanderheyden M, Paulus WJ. Dobutamine enhances cardiodepressant effects of receptor-mediated coronary endothelial stimulation. *Circ.* 1997; 95:90-96.
- [8] Baumgart D, Heusch G. Neuronal control of coronary blood flow. *Basic Res. Cardiol.* 1995; 90:142–159.
- [9] Baumgart D, Naber C, Haude M, Oldenburg O, Erbel R. G Protein b3 subunit 825T allele and enhanced coronary vasoconstriction on α -2-adrenoceptor activation. *Circ. Res.* 1999; 85:965–969.
- [10] Belmonte SL, Blaxall BC. G protein coupled receptor kinases as therapeutic targets in cardiovascular disease. *Circ. Res.* 2011; 109:309-319.
- [11] Bennett SJ, Pressler ML. Reconciling quality of life and beneficence in nursing practice: chronic dobutamine infusion in endstage heart failure--a case study. *Heart Lung.* 1995; 24:163-165.
- [12] Beohar N, Erdogan A, Lee DC, Sabbah HN, Kern MJ, Teerlink J, Bonow RO, Gheorghiade M. Acute heart failure syndromes and coronary perfusion. *Circ. Res.* 2008; 52:6–13.
- [13] Berkenboom G, Depierreux M, Fontaine J. Alterations of β -adrenoceptor mediated relaxation of atherosclerotic human coronary arteries. *Eur. Heart J.* 1989; 10:92–96.
- [14] Berkenboom G, Fontaine J, Degre S. The influence of atherosclerosis on the mechanical responses of human isolated coronary arteries to substance P, isoprenaline and noradrenaline. *Br. J. Pharmac.* 1987; 92:113–120.

- [15] Berthouze M, Laurent AC, Breckler M. New perspectives in cAMP-signaling modulation. *Curr. Heart Fail. Rep.* 2011; 8:159-167.
- [16] Bott-Flügel L, Bernshausen A, Schneider H, Luppä P, Zimmermann K, Albrecht-Küppner B, Kast R, Laugwitz KL, Ehmke H, Knorr A, Seyfarth M. Selective attenuation of norepinephrine release and stress-induced heart rate increase by partial adenosine A1 agonism. *PLoS One.* 2011; Mar 28; 6: e18048 [Epub ahead of print].
- [17] Bronzetti E, Felici L, Polindori C, Amenta F. Interactions between calcium channel blockers and α -adrenoceptors in the human coronary and mammary arteries: a radioligand binding study. *J. Auton Pharmacol* 1994; 14:79–85.
- [18] Cavalotti C, Bruzzone P, Mancone M. Catecholaminergic nerve fibers and β -adrenergic receptors in the human heart and coronary vessels. *Heart Vessels* 2002; 17:30–35.
- [19] Cho SC, Kim BN, Cummins TD, Kim JW, Bellgrove MA. Norepinephrine transporter -3081(A/T) and alpha-2A-adrenergic receptor Msp1 polymorphisms are associated with cardiovascular side effects of OROS-methylphenidate treatment. *J. Psychopharmacol.* May 2011 [epub ahead of print]
- [20] Cohen R. A, Shepherd J, Vanhoutte P. Prejunctional and postjunctional actions of endogenous norepinephrine at the sympathetic neuroeffector junction in canine coronary arteries. *Circ. Res.* 1983; 52:16-25.
- [21] Das UN. Vagal nerve stimulation in prevention and management of coronary heart disease. *World J. Cardiol.* 2011; 26:105-110.
- [22] Delahaye N, Le Guludec DL, Dinanian S, Delforge J, Slama MS, Sarda L, Dollé F, Mzabi H, Samuel D, Adams D, Syrota A, Merlet P. Myocardial muscarinic receptor upregulation and normal response to isoproterenol in denervated hearts by familial amyloid polyneuropathy. *Circ.* 2001; 104:2911-2916.
- [23] De Luca L, Fonarow GC, Adams KF, Mebazaa A, Tavazzi L, Swedberg K, Gheorghide M. Acute heart failure syndromes: clinical scenarios and pathophysiologic targets for therapy. *Heart Fail. Rev.* 2007; 12:97–104.
- [24] Dent MR, Tappia PS, Dhalla NS. Gender related alterations of β -adrenoceptor mechanisms in heart failure due to arteriovenous fistula. *J. Cell Physiol.* 2011 Oct 20. doi:10.1002/jcp.23058 [Epub ahead of print].
- [25] Dessy C, Moniotte S, Ghisdal P, Havaux X, Noirhomme P, Balligand JL. Endothelial β_3 -adrenoceptors mediate vasorelaxation of human coronary microarteries through nitric oxide and endothelium-dependent hyperpolarization. *Circ.* 2004; 110:948–954.

- [26] Dobrek Ł, Thor P. Neuroendocrine activation as a target of modern chronic heart failure pharmacotherapy. *Acta. Pol. Pharm.* 2011; 68:307-16.
- [27] Euteneuer F, Mills PJ, Rief W, Ziegler MG, Dimsdale JE. Subjective social status predicts in vivo responsiveness of β -adrenergic receptors. *Health Psychol.* 2011 Oct 24 [Epub ahead of print].
- [28] Feigl EO. No adrenergic constriction in isolated coronary arterioles? *Basic Res. Cardiol.* 1995; 90:70-72.
- [29] Ferro A, Kaumann A, Brown MJ. β -adrenoceptor subtypes in human coronary artery: desensitization of β_2 -adrenergic vasorelaxation by chronic β_1 -adrenergic stimulation in vitro. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1995; 25:134–141.
- [30] Förstermann U, Mügge A, Alheid U, Haverich A, Frölich JC. Selective attenuation of endothelium-mediated vasodilation in atherosclerotic human coronary arteries. *Circ. Res.* 1988; 62:185–190.
- [31] Fukuda S, Toriumi T, Xu H, Kinoshita H, Nishimaki H, Kokubun S, Fujiwara N, Fujihara H, Shimoji K. Enhanced beta-receptor-mediated vasorelaxation in hypoxic porcine coronary artery. *Am. J. Physiol.* 1999; 277:1447-1452.
- [32] Ghaleh B, Bea ML, Dubois-Rande JL. Endothelial modulation of β -adrenergic dilation of large coronary arteries in conscious dogs. *Circ.* 1995; 92:2627-2635.
- [33] Gilsbach R, Hein L. Are the pharmacology and physiology of $\alpha(2)$ -adrenoceptors determined by $\alpha(2)$ -heteroreceptors and autoreceptors, respectively? *Br. J. Pharmacol.* 2012; 165: 90-102.
- [34] Goyal RN, Bishnoi S. Simultaneous determination of epinephrine and norepinephrine in human blood plasma and urine samples using nanotubes modified edge plane pyrolytic graphite electrode. *Talanta.* 2011; 84:78-83.
- [35] Gregorini L, Fajadet J, Robert G, Cassagneau B. Coronary vasoconstriction after percutaneous transluminal coronary angioplasty is attenuated by antiadrenergic agents. *Circ. Res.* 1994; 90:895–907.
- [36] Gregorini L, Marco J, Farah B, Bernies M. Effects of selective α_1 - and α_2 -adrenergic blockade on coronary flow reserve after coronary stenting. *Circ.* 2002; 106:2901–2907.
- [37] Hausdorff WP, Caron MG, Lefkowitz RJ. Turning off the signal: desensitization of β -adrenergic receptor function. *FASEB J.* 1990; 4:2881–2889.
- [38] Hein TW, Kuo L. cAMP-independent dilation of coronary arterioles to adenosine : role of nitric oxide, G proteins, and K(ATP) channels. *Circ. Res.* 1999; 85:634-642.
- [39] Heusch G. α -adrenergic mechanisms in myocardial ischemia. *Circ.* 1990; 81:1–13.

- [40] Hoppe UC, Böhm M, Dietz R, Hanrath P, Kroemer HK, Osterspey A, Schmaltz AA, Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung, Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). Nationale Versorgungsleitlinie Chronische Herzinsuffizienz, 2009; abgerufen 09.01.2012 unter:<http://www.versorgungsleitlinien.de/themen/herzinsuffizienz>.
- [41] Indolfi C, Piscione F, Russolillo E, Villari B. Digoxin-induced vasoconstriction of normal and atherosclerotic epicardial coronary arteries. *Am. J. Cardiol.* 1991; 68:1274–1278.
- [42] Jones CJ, Kuo L, Davis MJ. α_1 -adrenergic responses of isolated canine coronary microvessels. *Basic Res. Cardiol.* 1995; 90:61–69.
- [43] Jumar A, Grün D, Lendner J, Krohn S, Zakrzewicz A, Ermilov E, Siegel G.. The effect of catecholamines in human coronary arteries. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, Abstracts 2011 Sci. Sessions, p. 219 (2011).
- [44] Katori T, Hoover D, Ardell JL, Helm RH, Belardi DF, Tocchetti CG, Forfia PR, Kass DA, Paolocci N. Calcitonin gene-related peptide in vivo positive inotropy is attributable to regional sympatho-stimulation and is blunted in congestive heart failure. *Circ. Res.* 2005; 96:234-243.
- [45] Kleber FX, Sabin GV, Thyroff-Friesinger U, Cabell B, Glogar D. Ibopamine as a valuable adjunct and substitute for dopamine in bridging therapy before heart transplantation. *Cardiology* 1992; 81:121-124.
- [46] Lefkowitz RJ, Caron MG. Adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.* 1988; 263:4993-4996.
- [47] Levine TB, Levine AB, Elliott WG, Narins B, Stomel RJ. Dobutamine as bridge to angiotensin-converting enzyme inhibitor-nitrate therapy in endstage heart failure. *Clin. Cardiol.* 2001; 24:231-236.
- [48] Löffler G, Heinrich PC, Petrides PE. Katecholamine – Molekularer Wirkungsmechanismus. In Löffler G, Heinrich PC, Petrides PE, eds. *Biochemie und Pathobiochemie*. 8. Auflage. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2007:829-830.
- [49] Luca L, Fonarow GC, Adams KF, Mebazaa A, Tavazii L, Swedberg K, Gheorghiane M. Acute heart failure syndromes: clinical scenarios and pathophysiologic targets for therapy. *Heart Fail. Rev.* 2007; 12:97–104.
- [50] Machida M, Takechi S, Fujimoto T, Kakinoki S, Nomura A. Carvedilol improves uptake-1 in patients with systolic congestive heart failure. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2011 Oct 12 [Epub ahead of print].

- [51] Maroski J, Vorderwülbecke BJ, Fiedorowicz K, Da Silva-Azevedo L, Siegel G, Marki A, Pries AR, Zakrzewicz A. Shear stress endothelial hyaluronan synthase 2 and hyaluronan synthesis especially in regard to an atheroprotective flow profile. *Exp. Physiol.* 2011; 96:977-986.
- [52] Maurice JP, Hata JA, Shah AS et al. Enhancement of cardiac function after adenoviral-mediated in vivo intracoronary β_2 -adrenergic receptor gene delivery. *J. Clin. Invest.* 1999; 104:21–29.
- [53] Miyashiro JK, Feigl EO. Feedforward control of coronary blood flow via coronary β -receptor stimulation. *Circ. Res.* 1993; 73:252–263.
- [54] Monopoli A, Conti A, Forlani A, Ongini E. β -1 and β -2 adrenoceptors are involved in mediating vasodilation in the human coronary artery. *Ital. Pharmacol. Soc.* 1993; 27:273–279.
- [55] Morgado M, Cairrão E, Santos-Silva AJ, Verde I. Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle. *Cell. Mol. Life Sci.* 2011; 69:247-266.
- [56] Mulvany MJ, Aalkjaer C. Structure and function of small arteries. *Physiol. Rev.* 1990; 70:921-961.
- [57] Mulvany MJ, Nilsson H, Flatman JA. Role of membrane potential in the response of rat small mesenteric arteries to exogenous noradrenaline stimulation. *J. Physiol. (Lond).* 1982; 332:363-373.
- [58] Naber C, Baumgard D, Siffert W, Oldenburg O, Huesing J, Erbel R. Role of the eNOS Glu298Asp variant on the GNB3825T allele dependent determination of α -adrenergic coronary constriction. *Pharmacogenetics* 2003; 13:279–284.
- [59] Nelson MT, Patlak JB, Worley JF, Standen NB. Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *Am. J. Physiol.* 1990; 259:3-18.
- [60] Nelson MT, Standen NB, Brayden JE, Worley JF. Noradrenaline contracts arteries by activating voltage-dependent calcium channels. *Nature* 1988; 336:382-385.
- [61] Neumann T, Biermann J, Neumann A, Wasem J, Ertl G, Dietz R, Erbel R. Herzinsuffizienz: Häufigster Grund für Krankenhausaufenthalte. *Dtsch. Arztebl. Int.* 2009, 106:269–275.
- [62] Newton GE, Azevedo ER, Parker JD. Inotropic and sympathetic responses to the intracoronary infusion of a β_2 -receptor agonist: A human in vivo study. *Circ.* 1999; 99:2402-2407.
- [63] Nyborg NC. Action of noradrenaline on isolated proximal and distal coronary arteries of rat: selective release of endothelium-derived relaxing factor in proximal arteries. *Br. J. Pharmacol.* 1990; 100:552-556.

- [64] Peuhkurinen KJ, Huikuri HV, Linnaluoto M, Takkunen JT. Changes in myocardial metabolism and transcardiac electrolytes during simulated ventricular tachycardia: effects of β -adrenergic blockade. *Am. Heart J.* 1993; 128:96–105.
- [65] Schmidt R, Lang F. Nerval vermittelte Durchblutungsregulation, Komponenten des basalen Gefäßtonus. In: Schmidt R, Lang F, eds. *Physiologie und Pathophysiologie*. 30. Auflage. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2007; 641- 648.
- [66] Schwinger RHG, Bohm M, Schulz C, Schmidt U, Schmidt B. Cardiac inotropic as well as coronary and pulmonary artery actions of epinine in human isolated tissues. *J. Pharmacol. Exper. Therap.* 1992; 30:345–357.
- [67] Siegel G. Membrane-physiologic reaction of arteriosclerotic coronary vessels to hypoxia in men. *Vasa.* 1994; 23:205-213.
- [68] Siegel G. Vascular smooth muscle. In Greger R, Windhorst U, eds. *Comprehensive human physiology*. 2. Auflage. Heidelberg: Springer-Verlag, 1996; 1941-1963.
- [69] Siegel G, Emden J, Wenzel K, Mironneau J, Stock G. Potassium channel activation in vascular smooth muscle. *Adv. Exp. Med Biol.* 1992; 311:53-72.
- [70] Siegel G, Malmsten M, Klüssendorf D, Hofer HW. Vascular smooth muscle, a multiply feedback-coupled system of high versatility, modulation and cell-signaling variability. In. *J. Microcirc. Clin. Exp.* 1997; 17:360-373.
- [71] Siegel G, Mironneau J, Schnalke F, Schröder G, Schulz BG, Grote J. Vasodilatation evoked by K^+ channel opening. *Prog. Clin. Biol. Res.* 1990; 327:299-306.
- [72] Siegel G, Rückborn K, Schnalke F, Grote J. Membrane physiological reactions of human arteriosclerotic coronary arteries to hypoxia. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1992; 12:217-220.
- [73] Siegel G, Rückborn K, Schnalke F, Müller J. Endothelial dysfunction in human atherosclerotic coronary arteries. *Eur. Heart J.* 1993; 14:99-103
- [74] Siegel G, Schnalke F, Stock G. Vasorelaxation in prostacyclin-hyperpolarized arterial smooth musculature. *Prog. Clin. Biol. Res.* 1989; 301:441-447.
- [75] Sizova YN, Tsirkin VI, Dvoryansky SA. Investigation into the role of endogenic modulators of chemoreactivity in regulation of coronary blood flow. *Russ. Physiol. J.* 2002; 88:856–864.
- [76] Shah AS, Lilly RE, Kypson AP, Tai O, Hata JA, Pippen A, Silvestry SC, Lefkowitz RJ, Glower DD, Koch WJ. Intracoronary adenovirus-mediated delivery and overexpression of the β_2 -adrenergic receptor in the heart: Prospects for molecular ventricular assistance. *Circ.* 2000; 101:408-414.

- [77] Statistisches Bundesamt 2006; abgerufen 04.10.2011 unter <http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Navigation/Statistiken/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.psml>.
- [78] Sun D, Huang A, Mital S, Kichuk MR, Marboe CC, Addonizio LJ, Michler RE, Koller A, Hintze TH, Kaley G. Norepinephrine elicits β -2-Receptor-mediated dilation of isolated human coronary arterioles. *Circ.* 2002; 106:550–555.
- [79] Tegtbur U, Busse M, Machold H, Brinkmeier U. Noradrenalin- und Laktatmetabolismus im doppelten Stufentest vor und nach 6-monatiger ambulanter kardialer Rehabilitation. *Sportmedizin (KCS)* 2001; 2:106-113.
- [80] Thalhofer HP, Hofer HW. Purification and properties of cyclic-3',5'-GMP-dependent protein kinase from the nematode *Ascaris suum*. *Arch. Biochem. Biophys.* 1989; 273:535-542.
- [81] Thalhofer HP, Starz W, Daum G, Wurster B, Harris BG, Hofer HW. Purification and properties of the cyclic 3',5'-AMP-binding protein from the muscle of the Nematode *Ascaris suum*. *Arch Biochem Biophys.* 1989; 271(2):471-478.
- [82] Tiefenbacher CP, DeFily DV, Chilian WM. Requisite role of cardiac myocytes in coronary α_1 -adrenergic constriction. *Circ.* 1998; 98:9–12.
- [83] Toda N. α -adrenoceptor subtypes and diltiazem actions in isolated human coronary arteries. *Am. J. Physiol.* 1986; 250:718–724.
- [84] Toda N, Enokibori M, Matsumoto, Okamura T. Responsiveness of dopamine of isolated epicardial coronary arteries from humans, monkeys and dogs. *Anesthesia Analgesia* 1993; 77:526–532.
- [85] Vasudevan NT, Mohan ML, Goswami SK, Naga Prasad SV. Regulation of β -adrenergic receptor function: An emphasis on receptor resensitization. *Cell Cycle.* 2011; 10:3684-3691.
- [86] Worley JF, Quayle JM, Standen NB, Nelson MT. Regulation of single calcium channels in cerebral arteries by voltage, serotonin, and dihydropyridines. *Am. J. Physiol.* 1991; 261:1951-1960.
- [87] Yan M, Zhang Y, Du XJ, Han C. Functional assessment of α_1 -AR subtypes in porcine coronary artery. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 1998; 25:682–685.
- [88] Yang H, Deng J, Bi X, Chang Q, Bai J, Pan M, Xiang H, Liu H, Li X, Liu Y, Li C. Nitric oxide formation contributes to β -adrenergic dilation of epicardial coronary arteries in response to intravenous administration of dobutamine in dogs. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol.* 2004; 24:189–191.

- [89] Yoshikawa T. Role of sympathoadrenal activations in congestive heart failure. *Nippon Rinsho*. 2006; 64:832-836.
- [90] Young MA, Knight DR, Vatner SF. Autonomic control of large coronary arteries and resistance vessels. *Progr. Cardiovasc. Dis.* 1987; 30:211–234.
- [91] Zugck C, Gerhards A, Kell R, Krüger C, Schellberg D, Katz N, Haass M. BNP ist ANP, Endothelin und Noradrenalin als Prognoseindikator bei chronisch herzinsuffizienten Patienten überlegen. *J. Kardiol.* 2001; 8:286-292.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Berlin, den 9.1.2012

Agnes Jumar

Publikationsliste

- Jumar A, Grün D, Lendner J, Krohn S, Zakrzewicz A, Ermilov E, Siegel G.. The effect of catecholamines in human coronary arteries. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, Abstracts 2011 Sci. Sessions, p. 219 (2011).

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Günter Siegel für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Physiologie der Medizinischen Fakultät Charité Berlin durchzuführen. Mit seiner Begeisterung für das Thema der Arbeit und Präsenz im Labor hat er wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Neben der hervorragenden Betreuung verstand er es, mich nachhaltig für die Wissenschaft zu begeistern.

Ferner möchte ich den Mitarbeitern des Institutes für ihr Entgegenkommen danken. Besonderer Dank gilt Frau Angela Becker für Ihre unschätzbare Unterstützung bei der Versuchsdurchführung und logistischen Planung sowie Herrn Dr. Eugeny Ermilov für seine wertvolle Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Für die gute Zusammenarbeit und Überlassung der Koronararterien aus Herztransplantationen danke ich dem Deutschen Herzzentrum Berlin unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Roland Hetzer. Ebenfalls danken möchte ich Herrn Professor Dr. Hans-Werner Hofer für die Hilfe bei der Bestimmung der sekundären Botenstoffe.

Des Weiteren bin ich dankbar für die gute Zusammenarbeit und tatkräftige Unterstützung der Mitglieder unserer Doktorandengruppe, Frau Janna Lendner, Herrn Daniel Grün und Herrn Stephan Krohn.

Besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen guten Freunden Andrea und Barbara, die durch ihre langjährige und unermüdliche Unterstützung entscheidend zum Gelingen der Arbeit beitrugen.

Den im Deutschen Herzzentrum Berlin transplantierten Patienten möchte ich meine Anerkennung und meinen Dank für die Bereitschaft zur Überlassung ihrer Organe aussprechen.

Erklärung

„Ich, Agnes Jumar, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Die Wirkung von Katecholaminen auf die Koronararterien des Menschen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 09.01.2012

Agnes Jumar